

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,
préparée à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles

ÉCOLE DOCTORALE
Innovation Thérapeutique, du fondamental à l'appliqué
Chimie Analytique

Par

Quentin Vanbellinghen

Imagerie de substances naturelles par spectrométrie de
masse

Soutenue le 07 octobre 2015 devant la Commission d'examen :

M. Pierre Champy	Professeur (Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry)	Président
Mme Isabelle Fournier	Professeur (Laboratoire PRISM, Université de Lille 1)	Rapporteur
M. Laurent Houssiau	Professeur (PMR, Université de Namur)	Rapporteur
M. Serge Della-Negra	Directeur de recherche (IPN, CNRS, Université Paris-Sud, Orsay)	Examineur
M. Didier Stien	Chargé de recherche (LBBM, UPMC/CNRS, Banyuls-sur-Mer)	Examineur
M. David Touboul	Chargé de recherche (ICSN, CNRS, Gif-sur-Yvette)	Examineur
M. Alain Brunelle	Directeur de recherche (ICSN, CNRS, Gif-sur-Yvette)	Directeur de thèse



À mes parents,

Pour l'amour que vous me portez et votre soutien.

À ma famille,

Car vous avez toujours été là pour moi.

À Sijia,

Pour tous les moments passés à deux et pour tous ceux qui viendront.

« Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre. »

Marie Curie

Merci ...

Aux membres de mon jury de thèse,

Monsieur le Docteur Alain Brunelle, pour le temps que tu as passé à me former au travail de chercheur et à m'avoir transmis tout ce que je sais aujourd'hui en spectrométrie de masse. Merci aussi pour ta patience, ta générosité et ta disponibilité.

Monsieur le Professeur Pierre Champy, pour avoir accepté de présider ce jury de thèse, de m'avoir encouragé avant ma soutenance. Je vous témoigne toute ma gratitude.

Madame le Professeur Isabelle Fournier, pour avoir accepté de suivre mon travail pour mon comité de suivi de thèse. Je vous remercie aussi d'avoir accepté de le rapporter pour ma soutenance.

Monsieur le Professeur Laurent Houssiau, pour avoir accepté de rapporter ce travail ainsi que de m'avoir contacté pour me transmettre vos commentaires.

Monsieur le Docteur David Touboul, pour ta pédagogie et ton sens critique que tu apportes au laboratoire, merci aussi d'avoir examiné cette thèse.

Monsieur le Docteur Didier Stien, pour avoir proposé le projet sur l'étude de la duraminisation d'une espèce tropicale mais aussi pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Monsieur le Docteur Serge Della-Negra, je te remercie pour avoir accepté de collaborer avec nous tout le long de mon doctorat mais aussi d'avoir accepté d'être examinateur dans mon jury de thèse.

Nos collaborateurs,

Michael J. Eller, Michèle Pautrat et Serge Della-Negra pour avoir accepté de travailler avec nous sur la caractérisation de l'extraction retardée en TOF-SIMS.

Nadine Amusant, Véronique Éparvier, Didier Stien, pour notre travail commun sur la duraminisation du bois.

Soizic Prado et Marine Vallet pour avoir proposé de collaborer avec nous dans votre projet sur l'étude d'organismes endophytes.

Nataly Bontemps, Julie Croué, Bernard Banaigs, pour votre sujet passionnant que vous nous avez apporté bien que nous n'eûmes de résultats satisfaisant. J'espère que ce travail aboutira par l'avenir.

Céline Pisapia et Bénédicte Ménéz pour avoir apporté des échantillons passionnants ainsi que de la bonne humeur devant le TOF-SIMS.

Mes collègues,

Paul Millares, je te remercie de m'avoir encadré pendant un an et demi. Bien que mon sujet fut éloigné du tien, tu as toujours réussi à me motiver et à me préparer aux différentes étapes de mon doctorat. Cette thèse n'aurait pas pu être aussi aboutie sans ton soutien. Je te suis infiniment reconnaissant.

Manale Noun, je te remercie pour la bonne humeur et l'expertise scientifique que tu as apportées à notre équipe. Je te souhaite le meilleur pour ta carrière.

Nicolas Elie pour ta gentillesse ainsi que pour ton dynamisme lors de nos travaux communs.

Vincent Guérineau, Jean-Pierre Le Caer, Isabelle Schmitz-Afonso, Manuela Argentini, David Cornu, Laila Sago et Alessandra Maia-Grondard, pour votre bonne humeur, votre disponibilité et votre gentillesse.

Laurent Laboureur, Hanane Kadar, Marie Taillandier, Marie Méjean, Tingting Fu, Natacha Bonneau et Ahmad Al Ali, ce fut un plaisir de travailler à vos côtés. Je vous souhaite à chacun le meilleur pour la suite.

Evelyne Cottureau, Pascale Richardin et Emmanuelle Delque-Kolic, je vous remercie de m'avoir aidé à préparer mon séminaire bibliographique sur la datation radiocarbone. Lors de nos entretiens j'ai appris beaucoup grâce à vous.

Aux stagiaires qui ont réalisé un travail remarquable, Sijia Liu, Stéphanie Boutet-Mercey, Cláudio Neves, Vytis Čižinauskas, Imane Abbas et Anaïs Oudot.

Lâm Quang Tran pour ton amitié, ta disponibilité et ton soutien.

Adrien Le Guennec et Gwladys Rivière pour toutes les discussions que nous avons échangées pendant nos repas du jeudi.

Je remercie aussi toutes les personnes que j'ai rencontrées pendant ma thèse, Claire Boulogne, Franck Chiappini, Jessica Marion et Julien Ruelle.

Liste des abréviations

BA : Burst Alignment	MALDI : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
CDA : Calcium Dependant Antibiotic	MC : Max Count
CHCA : α -Cyano-4-HydroxyCinnamic Acid	MCP : MicroChannel Plate
CMC : CarboxyMethylCellulose	OCT : Optimal Cutting Temperature
DE : Delayed Extraction	PAN TM : PANoramic mass resolution
DESI : Desorption ElectroSpray Ionisation	PCIS : PreCursor Ion Selector
DHB : 2,5-DiHydroxyBenzoic acid	PIDD : Primary Ion Dose Density
ECR : Electron Cyclotron Resonance	PLMS : Post Lift Metastable Suppressor
ESI : ElectroSpray Ionisation	REIMS : Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry
FWHM : Full Width at Half Maximum	ROI : Region Of Interest
HCBU : High Current Bunched	SID : Ion/Surface Collisions
LASER : Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation	SIMS : Secondary Ion Mass Spectrometry
LC-MS/MS : Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry	TC : Total Count
LESA : Liquid Extraction Surface Analysis	TDC : Time Digital Converter
LMIG : Liquid Metal Ion Gun	TOF : Time of Flight
	VDP : Variable Drift Path

Sommaire

I.	Introduction générale	3
II.	État de l'art	7
II.1.	Les méthodes de désorption-ionisation utilisées	7
II.1.1.	Spectrométrie de masse d'ions secondaires	7
II.1.1.a.	Histoire de la technique	7
II.1.1.b.	Principe du SIMS	8
II.1.1.c.	Modèles de pulvérisation.....	11
II.1.1.d.	Modèles d'ionisation	12
II.1.1.e.	Augmentation du rendement d'émission ionique secondaire.....	15
II.1.2.	Spectrométrie de masse par désorption/ionisation laser assistée par matrice	20
II.1.2.a.	Histoire de la technique	20
II.1.2.b.	Principe.....	21
II.1.2.c.	Modèles de désorption/ionisation.....	21
II.1.2.d.	Amélioration du rendement d'ionisation.....	22
II.1.3.	L'analyseur à temps de vol.....	23
II.1.3.a.	Historique	23
II.1.3.b.	Description de l'analyseur à temps de vol.....	23
II.1.3.c.	L'extraction retardée.....	26
II.1.3.d.	Les miroirs électrostatiques.....	26
II.1.4.	L'analyseur TOF-TOF	27
II.1.5.	Détection et traitement du signal.....	28
II.1.6.	L'imagerie TOF-SIMS	31
II.1.6.a.	Principe et applications.....	31
II.1.6.b.	Le couplage TOF-SIMS	32
II.1.6.c.	Intérêts et inconvénients du couplage TOF-SIMS	32
II.1.7.	Le spectromètre de masse TOF-SIMS IV	33
II.1.7.a.	La source d'ions à pointe liquide.....	33
II.1.7.b.	Canon à électron.....	36
II.1.7.c.	Analyseur.....	37
II.1.7.d.	Modes d'acquisition	37
II.1.8.	L'imagerie MALDI	39
II.1.8.a.	Dépôt de matrice avec le robot TM-Sprayer TM	42
II.1.8.b.	Le spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme	42

Sommaire

II.1.9. Les logiciels de retraitement.....	44
II.1.9.a. Surface Lab 6.....	44
II.1.9.b. FlexImaging.....	47
II.1.10. Conclusion sur l'état de l'art	48
II.1.11. Références	49
III. Méthodologie en imagerie TOF-SIMS	57
III.1. Introduction	57
III.2. Relation entre le courant d'ion primaire et la résolution spatiale.....	58
III.2.1. Brève description de l'anatomie du cervelet de rat.....	58
III.2.2. La cage de Faraday et les mesures de courant	59
III.2.3. Résolutions spatiales	60
III.2.4. Optimisation du courant pour les différents modes.	61
III.2.5. Effet de matrice	64
III.3. Extraction retardée pour combiner haute résolution en masse et spatiale ..	66
III.3.1. Protocole pour l'optimisation de l'extraction retardée	68
III.3.2. Optimisation de l'extraction retardée en mode BA+DE.....	68
III.3.3. Étude des paramètres de durée d'extraction retardée, énergie et masse des ions secondaires par simulation numérique.....	71
III.3.4. Application de l'extraction retardée à l'imagerie de lipides sur des sections de cerveau de rat	75
III.4. Conclusion et perspectives	78
III.5. Références	80
IV. Application de l'imagerie par spectrométrie de masse aux substances naturelles 1 ^{ère} partie : Étude de la duraminisation d'une espèce tropicale.....	85
IV.1.1.a. La structure et composition du bois	85
IV.1.1. Brève description de la cellule végétale	85
IV.1.2. Les tissus secondaires du bois	87
IV.1.3. Le bois juvénile et bois de réaction	90
IV.1.4. Types cellulaires	90
IV.1.5. Le bois : Un matériau structuré en trois-dimensions.....	93
IV.1.6. Frontière aubier/duramen et duraminisation	94
IV.1.7. Composition chimique du bois	96
IV.2. L'imagerie par spectrométrie de masse appliquée à l'étude du bois.....	100
IV.3. Méthodologie.....	103

Sommaire

IV.3.1.	Analyse de standards de composés extrait de <i>D. guianensis</i>	103
IV.3.2.	Préparation d'échantillon de bois pour l'imagerie par spectrométrie de masse	104
IV.3.3.	Choix de la méthode de préparation des coupes/surfaces transversales de bois	107
IV.3.4.	Analyse « stage scan » d'une surface radiale de <i>D. guianensis</i>	109
IV.3.5.	Application de la méthode <i>burst alignment + delayed extraction</i> aux échantillons de bois.....	110
IV.4.	Résultats.....	115
IV.4.1.	Analyse des standards.....	115
IV.1.1.	Analyse d'une coupe radiale de <i>D. guianensis</i>	116
IV.1.1.	Analyse d'une surface transversale de <i>D. guianensis</i>	117
IV.1.2.	Conclusion et perspectives	126
IV.1.3.	Références	128
V.	Application de l'imagerie par spectrométrie de masse aux substances naturelles	
2 ^{ème} partie :	Imagerie par spectrométrie de masse de micro-organismes.....	133
V.1.	État de l'art	133
V.1.	Les endophytes	137
V.1.1.	Définition	137
V.1.1.	Endophytes extraits de <i>Cephalotaxus harringtonia</i>	138
V.2.	Méthodologie.....	139
V.2.1.	Préparation d'échantillon pour l'imagerie MALDI-TOF de compétitions microbiennes	139
V.2.2.	Influence de la distance entre les souches	142
V.2.3.	Préparation d'échantillon pour l'imagerie TOF-SIMS de compétitions microbiennes	143
V.2.4.	Méthodes pour l'analyse des produits isolés.....	144
V.2.4.a.	MALDI-TOF	144
V.2.4.b.	TOF-SIMS	145
V.3.	Résultats.....	145
V.3.1.	Analyse des standards	145
V.3.1.a.	MALDI-TOF	145
V.3.1.b.	TOF-SIMS	148
V.3.2.	Imagerie MALDI-TOF.....	150
V.3.3.	Imagerie TOF-SIMS	155

Sommaire

V.4.	Conclusion et perspectives	161
V.5.	Références	162
VI	Conclusion générale	167
VII	Liste des illustrations.....	169
VIII	Annexe 1	183

Chapitre I

Introduction générale

I. Introduction générale

La spectrométrie de masse est une technique basée sur l'ionisation de molécules et/ou d'atomes et la mesure, à l'aide d'un analyseur, du rapport masse-sur-charge des ions formés. À l'aide de sources focalisées, il est possible d'ioniser localement des molécules caractéristiques d'une surface afin de reconstruire des cartes de densités ioniques dites images ioniques. Les techniques d'imagerie par spectrométrie de masse sont particulièrement indiquées pour obtenir simultanément la distribution spatiale de plusieurs espèces chimiques sur la surface d'un échantillon.

Des techniques d'imagerie par spectrométrie de masse, deux ont été employées pour ce travail qui sont basés sur ces principes :

- La spectrométrie de masse d'ionisation secondaire (SIMS pour *Secondary Ion Mass Spectrometry*) où un faisceau d'ions primaires focalisés entre 0,4 et 2 μm bombarde la surface à analyser. Pendant la collision avec la matière, les ions primaires apportent l'énergie nécessaire à un phénomène de désorption-ionisation. Les ions secondaires résultant sont ensuite extraits vers un analyseur par temps de vol (TOF pour *Time Of Flight*) pour mesurer leur rapport masse-sur-charge.
- La spectrométrie de masse de désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI pour *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation*) où une matrice absorbant à la longueur d'onde d'un laser pulsé apporte l'énergie pour désorber des molécules de la surface. La matière désorbée s'ionise ensuite en phase gazeuse par échange de proton avec la matrice. Un analyseur par temps de vol est aussi couplé à cette source d'ionisation.

Cette thèse a été financée par la fondation pour le développement de la chimie des substances naturelles, et les travaux sont également soutenus par le LabEx CEBA (Centre d'Étude de la Biodiversité Amazonienne). L'objectif de celle-ci a été d'appliquer l'imagerie par spectrométrie de masse aux substances naturelles, notamment celles détectées dans le bois. Une étude méthodologique en TOF-SIMS a été réalisée pour permettre d'obtenir une résolution spatiale inférieure à un micromètre tout en maintenant une résolution en masse satisfaisante pour séparer des ions quasi-isobariques. Parallèlement, une étude de la distribution des molécules impliquées dans des compétitions microbiennes a été effectuée en utilisant les outils d'imagerie par spectrométrie de masse.

Chapitre II

Introduction

II. État de l'art

II.1. Les méthodes de désorption-ionisation utilisées

Bien que les techniques de désorption-ionisation soient très variées, ce sont les techniques MALDI et SIMS qui ont été employées pour ce travail, et ce sont les seules qui seront décrites ici.

II.1.1. Spectrométrie de masse d'ions secondaires

II.1.1.a. Histoire de la technique

En 1910 Joseph John Thomson a décrit l'apparition de rayons secondaires (chargés positivement) lorsqu'une surface de métal est bombardée avec un rayon cathodique primaire [1,2]. Il s'agissait de l'une des premières observations d'ions secondaires. En 1931, James S. Thompson et K. S. Woodcock ont indépendamment décrit une méthode permettant de produire des ions secondaires chargés négativement en bombardant des surfaces de natures différentes [3,4]. Il a fallu attendre 1949 pour que Herzog et Viehböck fabriquent le premier instrument basé sur la technique SIMS [5]. Dans les années 60, Raymond Castaing et Georges Slodzian ont fabriqué un spectromètre SIMS couplé à un analyseur magnétique. Ce fut un des premiers spectromètres de masse destiné à l'imagerie [6]. La Figure 1a et b montre le schéma et une photographie de l'instrument construit par Castaing et Slodzian.

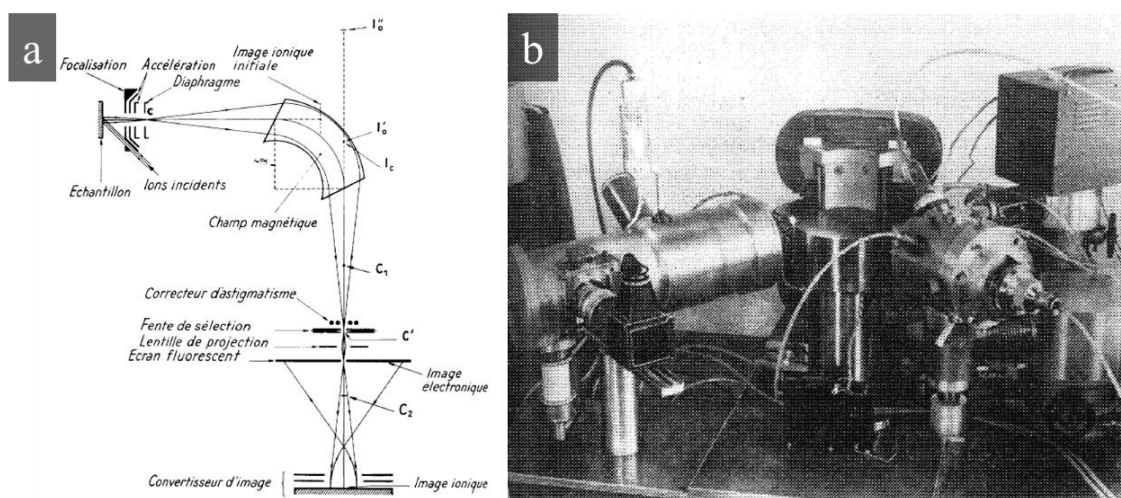


Figure 1 : Schéma (a) et photographie (b) de l'instrument basé sur la microanalyse par émission ionique secondaire construit par Castaing et Slodzian [6].

En 1970, l'équipe de Raymond Castaing a employé l'instrument précédemment développé pour obtenir des images ioniques de coupes histologiques de rein de lapin et de globules rouges humains [7]. La Figure 2a montre la distribution de l'ion Na^+ sur une surface de coupe de rein de lapin. La zone claire représente le milieu extra cellulaire et les points brillants représentent le noyau des cellules, la zone plus sombre a été attribuée au cytoplasme. La Figure 2b montre la distribution du sodium sur un dépôt de plasma humain. La zone claire représente le plasma et la zone plus sombre les globules rouges. Ces deux résultats représentent les premières images par spectrométrie de masse appliquée à l'analyse

d'échantillons biologiques. Il faut noter qu'à la même époque un instrument similaire avait été développé par Helmut Lielb pour des applications destinées à l'analyse de matériaux [8,9].

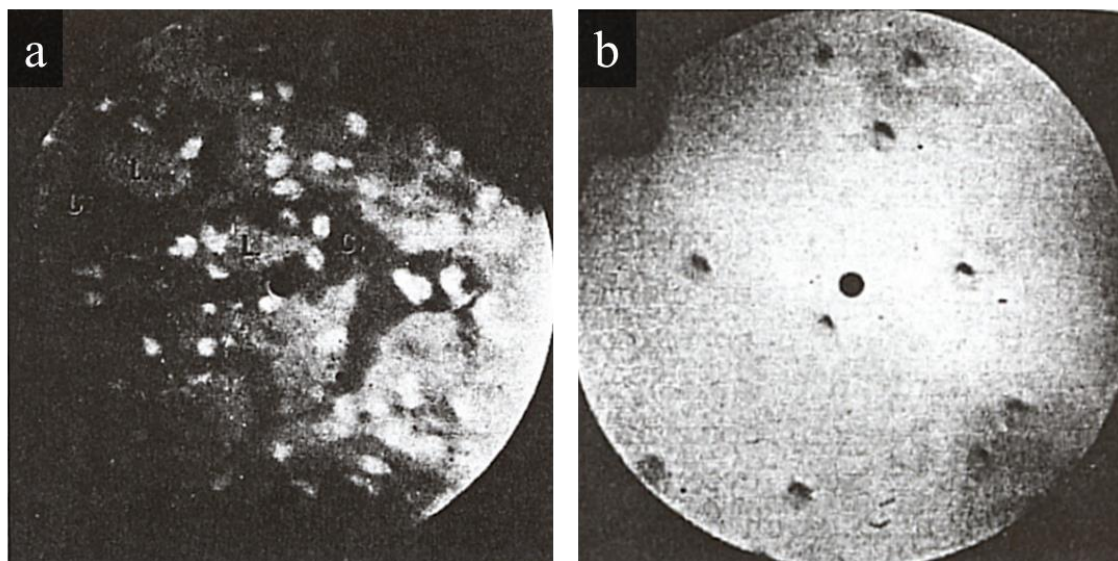


Figure 2 : Images ioniques de coupes de reins de lapin (a) et d'un dépôt de globule rouge humain (b) [7].

Avec les premières sources utilisées, les surfaces analysées étaient rapidement pulvérisées et endommagées, ce qui ne permettait pas l'analyse de molécules intactes. Alfred Benninghoven a été le premier à montrer qu'il est possible de désorber et ioniser des molécules intactes, en limitant la dose d'ions primaires, ce qui évite que statistiquement deux ions primaires bombardent la même zone [10]. Cette méthode d'analyse a été appelée SIMS-statique. À Princeton, une source SIMS¹ et un analyseur quadripolaire ont été couplés en 1977 par Magee *et al.* [11]. Celle-ci permettait de réaliser des expériences de profilage en profondeur et d'imagerie. Mais deux ans plus tôt Klaus Wittmaack et Gerhard Staudenmaier avaient déjà publié des résultats avec ce type de couplage [12]. Plus tard, Brian Chait et Kenneth Standing ont construit le premier TOF-SIMS, c'est-à-dire le premier couplage d'une source d'ions à un analyseur par temps de vol, qui a été initialement employé pour détecter des petites molécules comme de l'adénosine monophosphate [13].

II.1.1.b. Principe du SIMS

La technique SIMS est basée sur le bombardement d'une surface par les ions primaires, généralement accélérés à une énergie cinétique de plusieurs dizaines de keV. Ceci induit une émission de matière appelée pulvérisation. La majorité des particules éjectées de la surface sont neutres mais une faible quantité, environ 0,01 %, existe sous un état ionisé. En fonction de la matière pulvérisée, cette valeur de 0,01 % peut être différente. Les ions primaires pénètrent dans le solide à une distance comprise entre 100 et 500 Å. Des expériences ont été effectuées en pulvérisant un empilement de monocouches de Langmuir-Blodgett avec des ions primaires ayant des énergies cinétiques différentes. Les mesures ont montré que les ions secondaires de type $[M-H]^+$ provenaient toujours des cent premiers

¹ En spectrométrie de masse d'ions secondaires, il est commun d'appeler « la source » la partie du spectromètre de masse où sont produits les ions primaires. Pour les autres techniques, la source correspond au dispositif qui produit les ions à analyser.

Ångströms [14]. Les ions résultant, dits secondaires, sont ensuite extraits vers un analyseur où ils sont séparés en fonction de leur rapport masse-sur-charge. La Figure 3 illustre le principe de la pulvérisation. Quelques définitions suivent ce paragraphe pour comprendre le langage associé à cette technique.

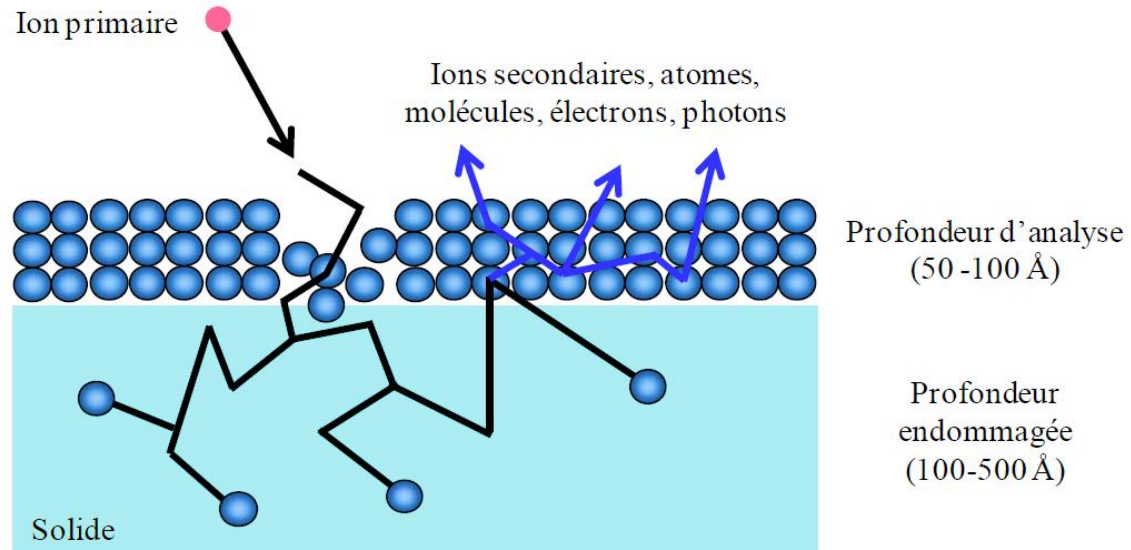


Figure 3 : Schéma simplifié du principe de la pulvérisation [15].

Le nombre de particules émises après pulvérisation d'un certain nombre d'ions primaires est appelé le rendement de pulvérisation noté Y_p .

$$Y_p = \frac{\text{nombre de particules émises}}{\text{nombre total d'ions primaires}} \quad \text{Équation 1}$$

Généralement, le paramètre mesuré en SIMS est le rendement d'émission ionique secondaire Y qui représente le nombre d'ions secondaires émis par ion primaire bombardant la surface.

$$Y = \frac{\text{nombre de particules chargées émises}}{\text{nombre total d'ions primaires}} \quad \text{Équation 2}$$

Pour effectuer des mesures absolues de ces rendements, la transmission de l'analyseur et l'efficacité de la détection sont à prendre en compte.

Le rendement va dépendre de plusieurs facteurs :

- La nature des ions primaires utilisés,
- L'énergie cinétique des ions primaires,
- La composition de la surface,
- L'angle d'incidence des ions primaires,

Pour chaque analyse, un paramètre important est le nombre d'ions primaires utilisés pour bombarder la surface. Ce paramètre est appelé la PIDD pour *Primary Ion Dose Density* qui se traduit en français par densité de dose d'ions primaires ou encore fluence. Une densité de dose étant en réalité un pléonasme, le terme dose d'ions primaires sera favorisé. La formule suivante définit la dose d'ions primaires :

$$\text{Dose d'ions primaires (ions/cm}^2\text{)} = \frac{i \times t}{q \times A} \quad \text{Équation 3}$$

i est égal au courant d'ions primaires, t le temps d'irradiation, q la charge de l'ion primaire et A l'aire de la surface irradiée.

Deux modes d'utilisation du SIMS sont distingués en fonction de la dose d'ions primaires déposée. En limitant la dose d'ions primaire à une valeur inférieure à 10^{13} ions·cm⁻² l'analyse s'opère dans un mode dit statique où la probabilité est faible que deux ions primaires bombardent la même zone au cours de l'analyse. Ce régime est adapté pour analyser la signature chimique de la couche superficielle de la surface avec un endommagement modéré de la surface. Cela permet des applications en imagerie moléculaire. À des valeurs d'ions primaires supérieures à 10^{16} ions·cm⁻² l'analyse s'opère en mode dynamique. Ce régime est destiné à l'analyse d'éléments pour suivre leur distribution en profondeur. Dû à l'endommagement, le régime dynamique ne permet pas d'analyser des molécules intactes avec des projectiles monoatomiques et des agrégats métalliques. En fonction de la nature de la surface analysée, l'endommagement n'est pas le même. La section efficace d'endommagement, notée σ , est une grandeur qui permet de caractériser cet endommagement de la surface par les ions primaires. Celle-ci est définie comme étant l'aire endommagée par chaque impact d'un ion primaire. La section efficace d'endommagement se calcule en mesurant la diminution du signal en fonction de la dose d'ions primaires selon la formule suivante :

$$N(t) = N_{(t=0)} \times e^{\left(\frac{-\sigma \times i \times t}{q \times A}\right)} = N_{(t=0)} \times e^{(-\sigma \times PIDD)} \quad \text{Équation 4}$$

L'efficacité est donnée par la relation suivante :

$$E = \frac{Y}{\sigma} \quad \text{Équation 5}$$

Dans cette équation, E représente le nombre d'ions secondaires détectés pour une espèce donnée par unité de surface endommagée. Pour obtenir une efficacité optimale, le rendement d'émission doit être élevé et / ou la section efficace d'endommagement doit être faible. La Figure 4a montre qu'avec une section efficace d'endommagement élevée et un rendement d'ionisation élevée, l'efficacité sera équivalente à celle ayant un rendement et une section efficace d'endommagement faibles. La Figure 4b montre que pour améliorer l'efficacité, le rendement d'émission doit augmenter plus que la section efficace d'endommagement.

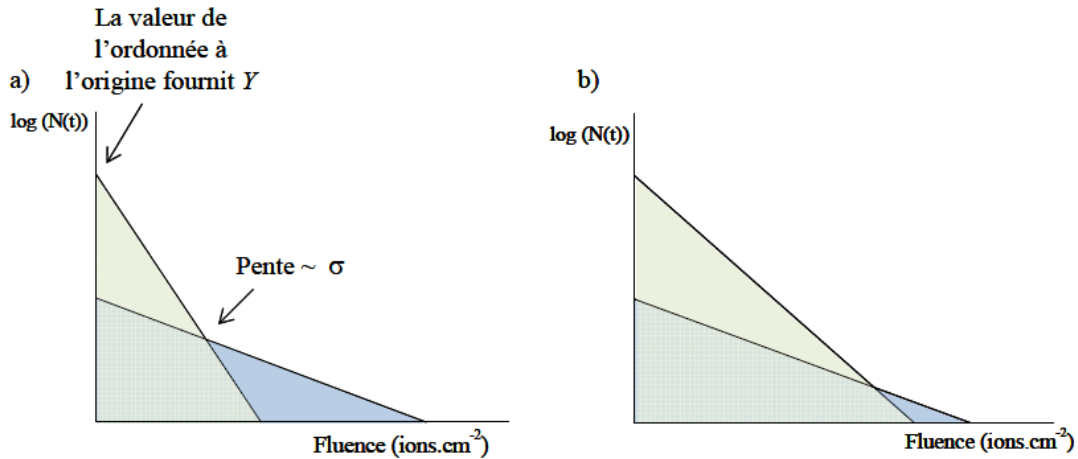


Figure 4 : Schéma illustrant l'influence du rendement d'émission ionique secondaire Y et de la section efficace d'endommagement σ sur l'efficacité [15].

Connaissant l'efficacité, la résolution latérale utile est un paramètre définissant la surface minimale permettant de détecter n ions secondaires. La valeur de n est généralement fixée à 4 pour obtenir le minimum de contraste acceptable pour interpréter une image. Ce paramètre est calculé avec l'Équation 6 :

$$\Delta L = \left(\frac{n}{E}\right)^{1/2} \quad \text{Équation 6}$$

II.1.1.c. Modèles de pulvérisation

Lorsque qu'un ion primaire pénètre dans l'échantillon, l'énergie cinétique de celui-ci est transférée à la matière entraînant un phénomène de pulvérisation. L'énergie cinétique de l'ion primaire est transférée aux atomes du solide sous forme de collisions qui peuvent être selon la valeur de l'énergie cinétique, élastiques (pour un ion primaire ayant une énergie de quelques keV à quelques centaines de keV) ou inélastiques (pour un ion primaire ayant une énergie de l'ordre du MeV). Dans le cadre d'une collision élastique, l'énergie est déposée à travers une série de collisions entre les atomes du projectile et ceux de l'échantillon. Dans ce cas, un changement de la trajectoire de l'ion primaire incident est constaté. Si l'ion primaire est plus « rapide » (collision inélastique) l'énergie est déposée par excitation électronique [2]. L'instrument employé pendant cette thèse fonctionne avec un faisceau d'agrégats de bismuth accélérés à une énergie de 25 keV. Le mode de collision est donc de type élastique et peut être décrit par plusieurs modèles brièvement décrits dans les sections suivantes.

Recul direct

Si l'énergie de recul (énergie cinétique transférée après l'impact d'un ion primaire) est supérieure aux énergies de liaison d'un atome situé à la partie externe de la surface (*surface binding energy*), alors des atomes sont émis. Seuls les atomes de la surface sont concernés. Ce processus est appelé *prompt collisional sputtering*. Dans ce modèle, l'émission d'un atome en surface est possible s'il obtient une quantité de mouvement suffisante en direction opposée au solide [2,16]. Un schéma de ce modèle est présenté en Figure 5a.

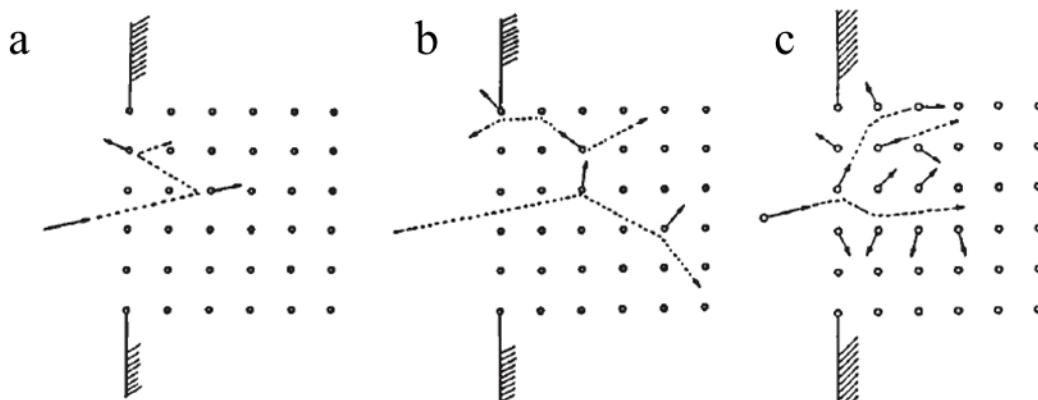


Figure 5 : Schéma de différents modèles de pulvérisation : Modèle du recul direct (a) Modèle de cascade linéaire (b) Modèle de pointe thermique [16].

Modèle de cascade linéaire

Dans le modèle de cascade linéaire, schématisé en Figure 5b, une succession de collisions se produit entre les atomes du solide où chaque cascade est séparée l'une de l'autre. Les projectiles entrent toujours en collision avec des atomes au repos. Dans ce modèle, le recul direct d'atomes de la surface est dominant mais la pulvérisation peut provenir d'un point plus distant de la surface. Ce processus est appelé *slow collisionnal sputtering*. Ce modèle de cascade linéaire est valable pour des ions primaires monoatomiques ou diatomiques de masse légère ayant une forte pénétration dans le solide. Dans le cas d'ions atomiques lourds et d'agrégat massif, le modèle de cascade linéaire n'est plus adéquat car les collisions se superposent [2,16].

Modèle de cascade non-linéaire

Lorsque l'énergie déposée est plus dense, par exemple lorsque des agrégats sont utilisés, il y a tellement de collisions induites dans le solide que des atomes en mouvement entrent en collision non seulement avec des atomes au repos comme précédemment, mais aussi avec des atomes en mouvement. Ce phénomène de pulvérisation peut s'apparenter à une vaporisation/sublimation de la surface. Ce modèle peut conduire à plusieurs explications, l'agitation moléculaire augmente localement la température (*thermal spike*), [2,16]. Le schéma de ce modèle est disponible en Figure 5c.

Les modélisations de la pulvérisation permettent de décrire les interactions entre l'ion primaire et les atomes du solide. Cependant elles ne prennent pas en compte le mécanisme d'ionisation des particules émises. Les sections suivantes décrivent brièvement les modèles les plus couramment utilisés pour expliquer le phénomène d'ionisation suivant la pulvérisation.

II.1.1.d. Modèles d'ionisation

Des particules pulvérisées, seulement environ 0,01 % sont dans un état ionisé. Pour expliquer ce faible rendement, plusieurs modèles ont été proposés.

Dissociation d'appariement d'ions (bond breaking)

Ce modèle est destiné à expliquer l'émission d'ions provenant de la pulvérisation d'une surface inorganique. Celui-ci propose un phénomène de désorption d'ions préexistants

sans modification de leurs états de charge. Ce concept avait été introduit par Slodzian et Hennequin qui avaient remarqué que le rendement d'ions positifs augmentait sur des surfaces métalliques oxydés [17]. La Figure 6 montre les courbes d'énergie potentielle en fonction de la distance entre deux noyaux de sodium et de chlore. Lorsque la molécule est à l'état fondamental les atomes ou les ions sont liés par attraction coulombienne. L'état final de la particule dépend de la distance internucléaire à laquelle les courbes d'énergie potentielle de dissociation ionique et covalente se croisent (distance R_c) [18]. L'impact d'un ion primaire permet d'atteindre la distance R_c et d'émettre des ions depuis la surface.

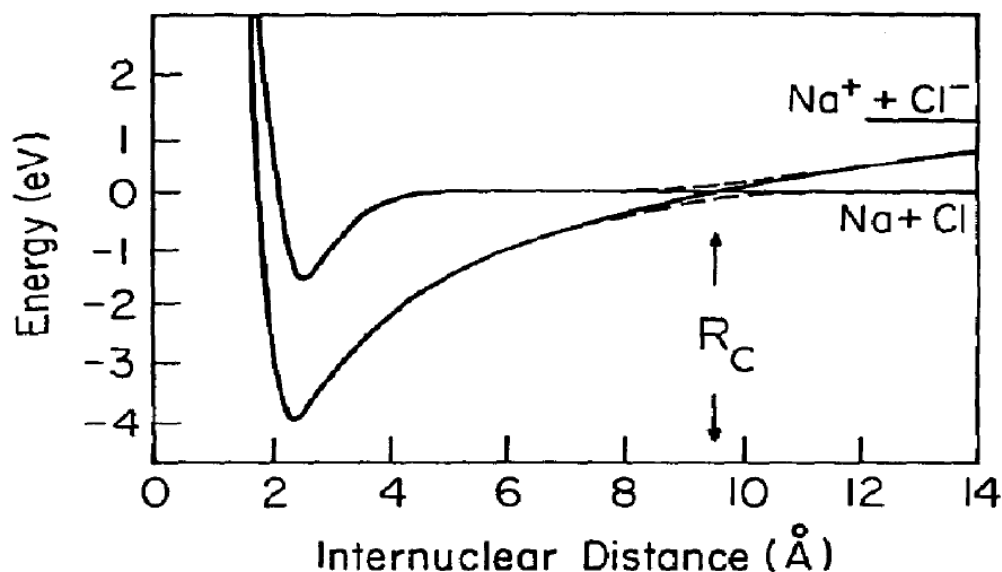


Figure 6 : Dissociation d'une paire d'ions.

Modèle moléculaire

Le modèle moléculaire (*nascent model*) propose une autre explication à l'augmentation d'ionisation pour des oxydes métalliques. Ici, les particules éjectées sont des oxydes métalliques qui se neutralisent par une transition électronique rapide au niveau de la surface. Ces particules neutralisés se dissocient dans le vide lorsque le potentiel de surface n'affecte plus les particules [19,20]. Ces modèles permettent d'expliquer la formation d'ions inorganiques mais pas celle d'ions organiques.

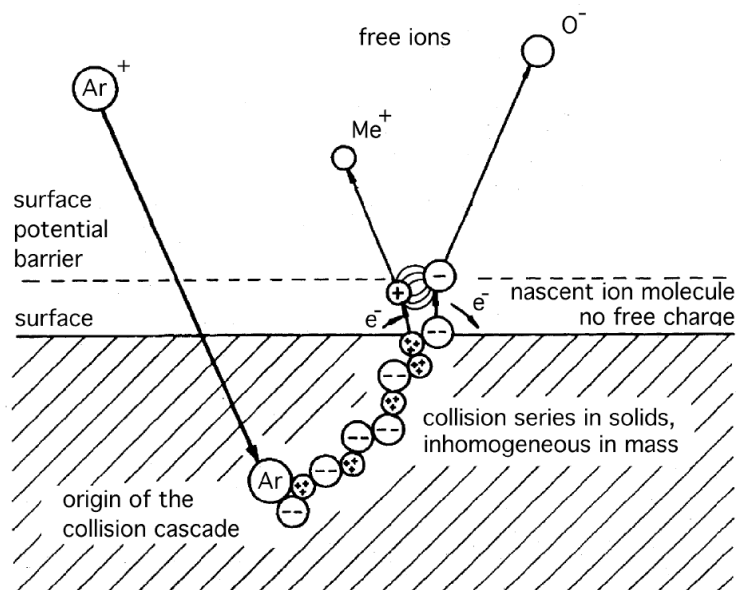


Figure 7 : Principe du modèle moléculaire. Les ions sont formés en phase gazeuse après dissociation d'un complexe métal oxyde neutre.

Modèle de désorption/ionisation

Un autre modèle propose d'expliquer l'ionisation des ions secondaires en SIMS. La Figure 8 illustre les réactions en phase gazeuse proposés par le modèle. Dans ce modèle, l'énergie déposée lors de l'impact est convertie en énergie vibrationnelle [21]. Ce modèle explique l'émission d'agrégats et d'ions préformés émis depuis la surface. La majorité des espèces émises sont neutres. À la suite du phénomène de désorption, l'ionisation se produit par des processus d'association entre des molécules neutres et des ions préformés (formation d'adduit/cationisation). Les autres ions sont générés suivant deux types de réaction :

- Au niveau de la surface, des réactions entre les ions et les molécules neutres se produisent, ainsi que des ionisations électroniques (potentiel de la surface).
- Dans l'espace libre de champ, des réactions de dissociation se produisent.

Le modèle explique aussi que parmi les particules émises des agrégats sont formés et suivent une désolvatation limitant la taille des agrégats.

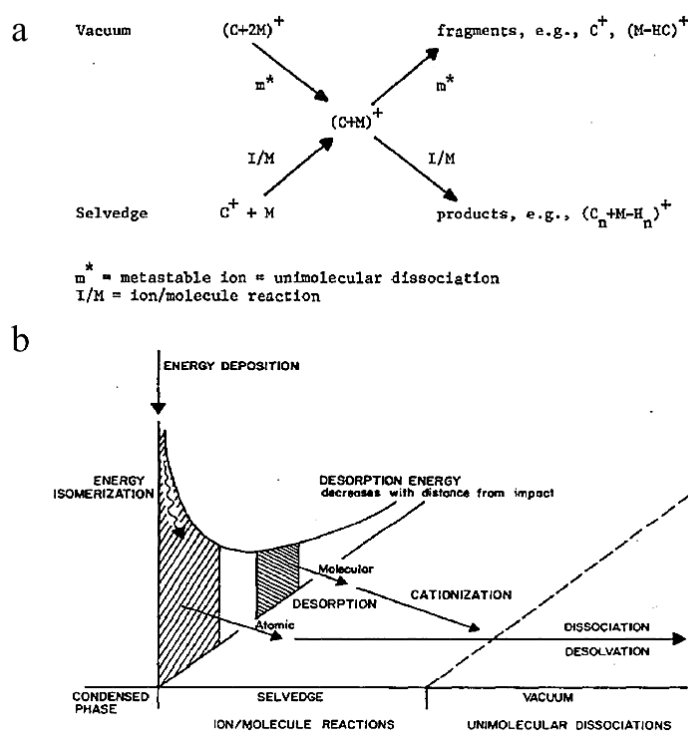


Figure 8 : Réactions mise en jeu (a) et schéma du principe (b) du modèle de désorption ionisation [21].

Modèle à effet tunnel électronique

Il existe un autre modèle d'ionisation appelé le modèle à effet tunnel électronique. Celui-ci permet de décrire l'ionisation d'atomes pulvérisés depuis un échantillon conducteur ou semi-conducteur où les électrons de la bande de conduction ne sont pas localisés.

II.1.1.e. Augmentation du rendement d'émission ionique secondaire

Dans les années 70, Andersen et Bay ont mesuré à l'aide d'une microbalance à quartz la masse de couches d'argent ou d'or pulvérisées après bombardement de différentes espèces d'ions primaires [22,23]. Ces études avaient mis en évidence un effet non linéaire du rendement de pulvérisation en augmentant le nombre d'atomes constituant l'ion primaire, c'est-à-dire que le rendement de pulvérisation induit par un projectile contenant n atomes est supérieur à n fois le rendement induit par des projectiles monoatomiques de même vitesse. Depuis la fin des années 80, des sources d'ions polyatomiques ont été mises au point. En 1987, Reuter utilise une source CF_3^+ et mesure un meilleur rendement d'ionisation que pour une source O_2^+ [24]. En 1989, est développée une source SF_6^+ [25]. Un meilleur rendement d'ionisation que les sources monoatomiques avait été constaté. La même année, Blain *et al.* produisent par désorption plasma des agrégats de d'iodure de césium (Cs^+ , Cs_2I^+ et $Cs_3I_2^+$), ces ions étant ensuite utilisés comme ions primaires pour mesurer le rendement d'ionisation de différentes surfaces comme un dépôt de phénylalanine ou de l'or [26]. Pour chaque surface, une augmentation non linéaire du rendement d'ionisation en fonction de l'énergie par unité de masse des projectiles avait été mise en évidence. En 1991, cette expérience avait été reproduite en utilisant des agrégats d'or de masse différents [27]. Les résultats obtenus ont confirmé les premières mesures (Figure 9).

À même vitesse qu'un projectile monoatomique, un projectile polyatomique va déposer une plus grande densité d'énergie dans le solide, favorisant ainsi le régime de cascades non-linéaires et de pointes thermiques.

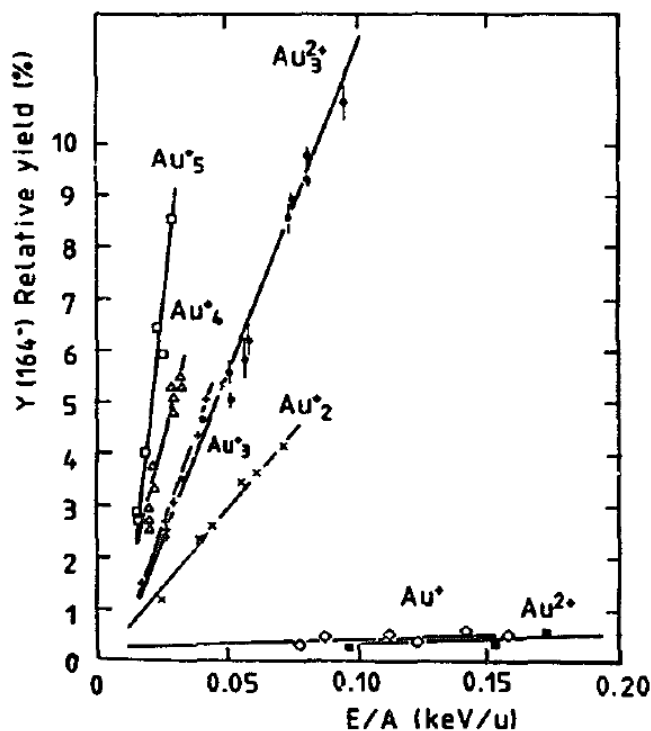


Figure 9 : Rendement d'émission ionique secondaire de l'ion moléculaire de phénylalanine [M-H]⁺ à m/z 164,2 en fonction de l'énergie cinétique par unité de masse des ions primaires. Les ions primaires sont des agrégats d'or de type Au_n^{q+} avec n=1 à 5 et q= 1 ou 2 [27].

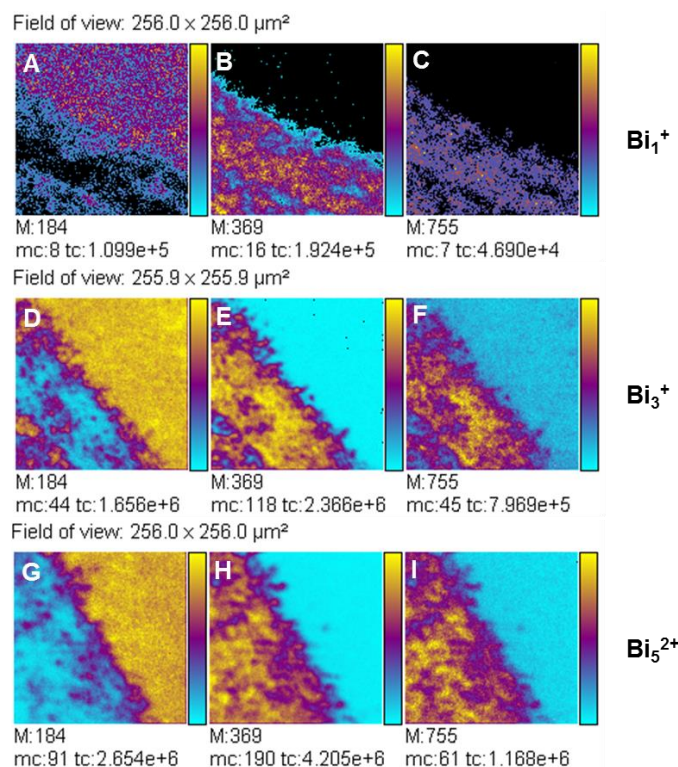


Figure 10 : Images TOF-SIMS en bordure d'un corps calleux d'une coupe de cerveau de rat en mode d'ionisation positif. Chaque ligne correspond à une sélection différente des ions primaires et chaque colonne à un ion de masse-sur-charge différent [28].

Si on passe ensuite directement au point de vue de l'analyse de surfaces biologiques, la Figure 10 montre le résultat d'acquisitions effectuées en sélectionnant respectivement les ions Bi^+ , Bi_3^+ et Bi_5^{2+} irradiant chacun avec la même dose une région en bordure du corps calleux de coupe de cerveau de rat [28]. Les images reconstruites correspondent aux distributions spatiales d'un fragment de la phosphocholine à m/z 184, au cholestérol à m/z 369 et d'un phospholipide à m/z 755. Une amélioration des contrastes et une augmentation de la sensibilité sont constatés lorsque des ions polyatomiques sont utilisés comme projectiles.

Après l'utilisation d'agrégats métalliques, des équipes ont employé des ions polyatomiques constitués de nombreux atomes légers comme le fullerène et les agrégats d'argon [29,30,31,32,33,34]. Ces constituants permettent de pulvériser la surface avec une faible énergie par atome. Cela induit une faible pénétration dans le solide bombardé, une très grande densité d'énergie déposée près de la surface, et un fort rendement de pulvérisation. De plus, l'avantage de ces projectiles est de produire en profondeur un endommagement très modéré par rapport à des ions monoatomiques ou des agrégats métalliques [35]. La Figure 11 montre les résultats de simulations informatiques de dynamique moléculaire d'une surface d'argent pulvérisée par soit un agrégat d' Au_3 , de C_{60} ou d' Ar_{872} . Ces simulations publiées par Postawa *et al.* montrent que la résolution de profilage en profondeur est meilleure si la surface était pulvérisée par de l'argon plutôt que des fullerènes ou un agrégat de trois atomes d'or. De plus, les agrégats de C_{60} ou d'argon permettent d'augmenter significativement le taux de pulvérisation et par conséquent plus d'ions moléculaires sont émis. La Figure 12 montre les rendements d'émission ionique secondaire d'ions moléculaires en mode négatif

émis depuis une cible de phénylalanine et d'une monocouche de Langmuir-Blodgett sous un bombardement d' Au_4^+ et de C_{60}^+ . Les résultats sont donnés pour différentes valeurs d'énergie par unité de masse. Pour des valeurs d'énergie par unité de masse identiques, c'est-à-dire pour des vitesses identiques, le rendement d'émission ionique secondaire mesuré sous bombardement de C_{60}^+ est supérieur à celui mesuré sous bombardement d' Au_4^+ . L'explication est que les agrégats constitués d'un grand nombre d'atomes légers déposent leur énergie dans une moindre profondeur que les agrégats constitués d'un petit nombre d'atomes lourds [29].

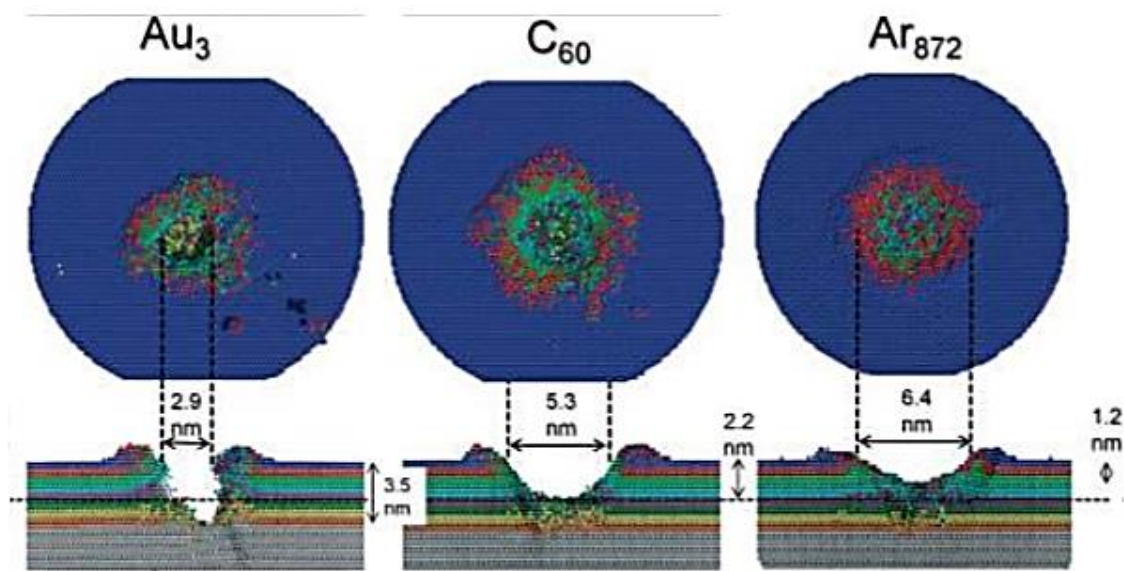


Figure 11 : Vues transversale et radiale d'un cratère sur une surface d'argent après impact d'un agrégat d' Au_3 , C_{60} , et Ar_{872} accéléré à 20 keV. Les résultats proviennent de simulations informatiques, les couleurs permettent de localiser les atomes provenant d'une couche donnée [35].

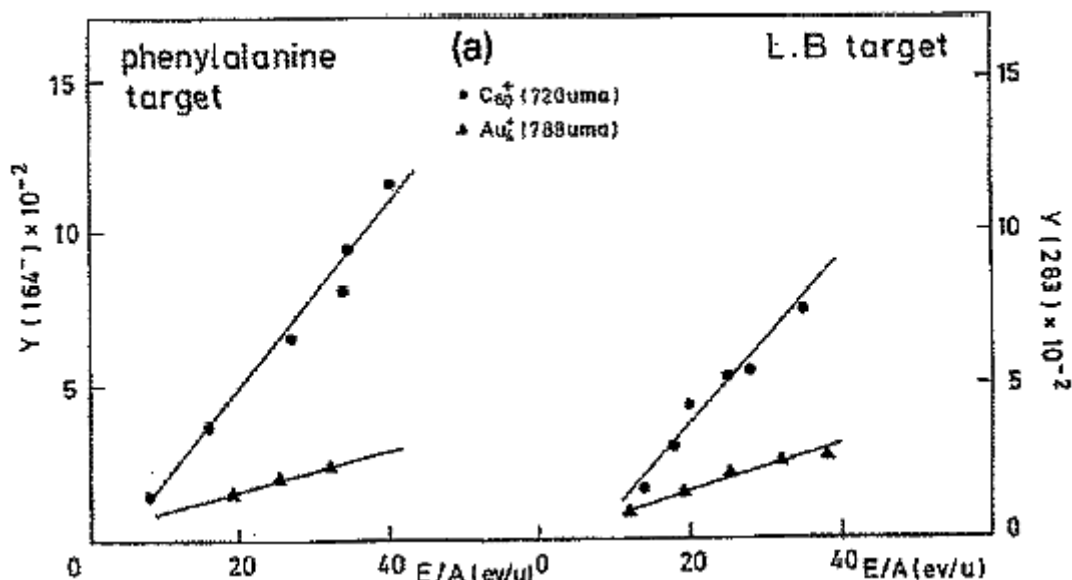


Figure 12 : Rendement d'émission secondaire d'ions moléculaires de phénylalanine et de d'une monocouche de Langmuir-Blodgett pour des projectiles d' Au_4^+ et de C_{60}^+ à différentes énergies [29].

En 2012, Shard *et al.* ont montré que sur des matériaux multicouches d'Irganox 1010 séparé d'une couche d'Irganox 3114 de 1 nm d'épaisseur tous les 50, 100, 200 et 300 nm, les

faisceau d'argon permettent une analyse en profondeur avec une meilleure résolution que les faisceaux de fullerène [36]. Cela est expliqué par une énergie par atome pour les agrégats d'argon inférieure à celle du fullerène. Ces résultats confirment les simulations de Postawa. Aujourd'hui, ces agrégats sont de plus en plus utilisés pour des études de profilage en profondeur et d'imagerie en trois-dimensions dans des échantillons organiques [37,38,39,40]. Mais il est à noter que le principe de l'imagerie en trois dimensions existe depuis l'utilisation d' O_2^+ et de Cs^+ comme ions primaires [41,42,43]. La grande nouveauté est que les très faibles endommagements en profondeur induits par les agrégats massifs d'argon permettent maintenant de faire la même chose mais dans de la matière organique.

Ces faisceaux d'agrégats d'argon ne pouvant pas être focalisés comme des faisceaux d'agrégats métalliques, les analyses s'effectuent donc en *dual beam*, où un faisceau d'agrégats métalliques focalisé à quelques centaines de nanomètres effectue une analyse de surface après chaque cycle de pulvérisation effectué par la source d'agrégats d'argon [44,45]. La Figure 13 illustre le résultat d'une telle analyse effectuée sur une coupe de cerveau de rat déposée sur une plaque de silicium. Les images ioniques correspondent à la distribution spatiale du cholestérol, de la phosphocholine 34:1 et du silicium respectivement en vert, bleu et rouge. Ces sources peuvent aussi être utilisées pour nettoyer les surfaces d'éventuelles contaminations. Enfin, au lieu de les utiliser pour l'imagerie trois-dimensions, le signal ionique peut être sommé sur toute la profondeur analysée afin d'augmenter la sensibilité de l'analyse.

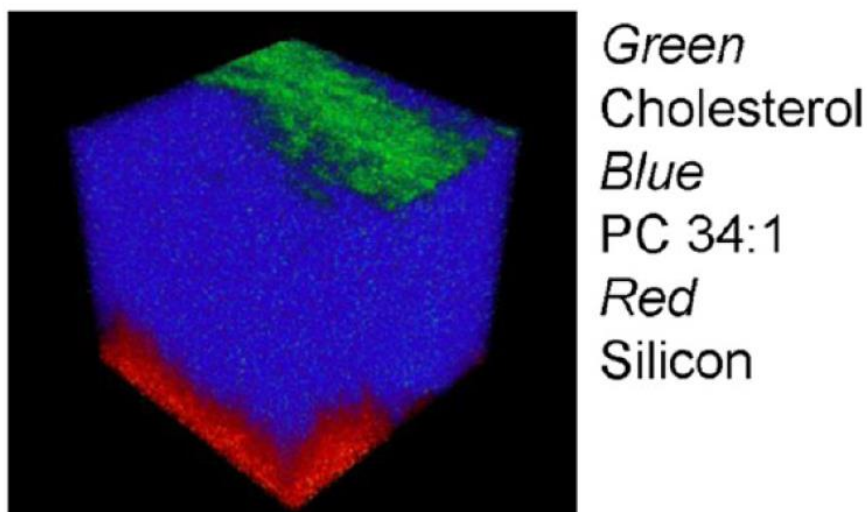


Figure 13 : Reconstruction en trois dimensions de la distribution de trois ions d'une surface analysée en *dual beam depth profiling* [45].

Récemment l'équipe de John C. Vickerman a publié ses résultats sur une nouvelle source d'agrégats d'eau. Comparée à une source d'agrégat d'argon, celle-ci permet d'augmenter le rendement d'ionisation secondaire par un facteur 10 [46,47,48].

II.1.2. Spectrométrie de masse par désorption/ionisation laser assistée par matrice

II.1.2.a. Histoire de la technique

Le laser est un acronyme signifiant *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* soit amplification de la lumière par émission stimulée de rayonnement. Cette source de rayonnement est basée sur l'émission stimulée décrite par Albert Einstein. Une émission stimulée correspond à l'interaction d'un photon avec des électrons sur une orbitale excitée d'un atome. Cette interaction provoque une désexcitation de ces électrons. L'énergie dégagée lors du retour de l'électron à un état d'énergie plus faible produit un photon ayant les mêmes propriétés que le photon incident. Dans les années 60, les scientifiques arrivent à construire les premiers lasers. Rapidement, cette source de rayonnement est étudiée pour sa capacité à produire des plasmas [49] ou ioniser un gaz [50]. En 1963, Honig et Woolston construisent la première source d'ionisation laser couplée à un analyseur à secteur magnétique [51]. Cet instrument permettait de « vaporiser » des petits volumes et d'en analyser la composition élémentaire. Un schéma de cet appareil est présenté en Figure 14.

À la fin des années 70 et au début des années 80, la désorption laser avait été employée pour analyser des molécules organiques polaires [52,53]. Un peu plus tard, deux équipes ont découvert qu'il était possible d'utiliser une matrice organique ou un mélange de glycérol et de nanoparticules de cobalt pour favoriser l'ionisation de molécules organiques et de protéines [54,55]. La première référence d'une utilisation d'une matrice pour améliorer le rendement d'ionisation d'ions organiques quasi-moléculaires provenait d'un article publié par l'équipe d'Hillenkamp [56]. En 2002, Koichi Tanaka partagea avec John Bennett Fenn et Kurt Wüthrich le prix Nobel de Chimie pour avoir développé chacun une nouvelle technique permettant l'analyse de macromolécules biologiques. Depuis, c'est la méthode de préparation d'échantillon publiée par Karas, et Hillenkamp qui a été la plus popularisée. Cette technique a connu de nombreuses améliorations et est utilisée aujourd'hui pour des applications allant de la protéomique à l'analyse de petites molécules en passant par l'analyse d'ARN, de polymères, et à l'imagerie par spectrométrie de masse [57,58,59,60,61].

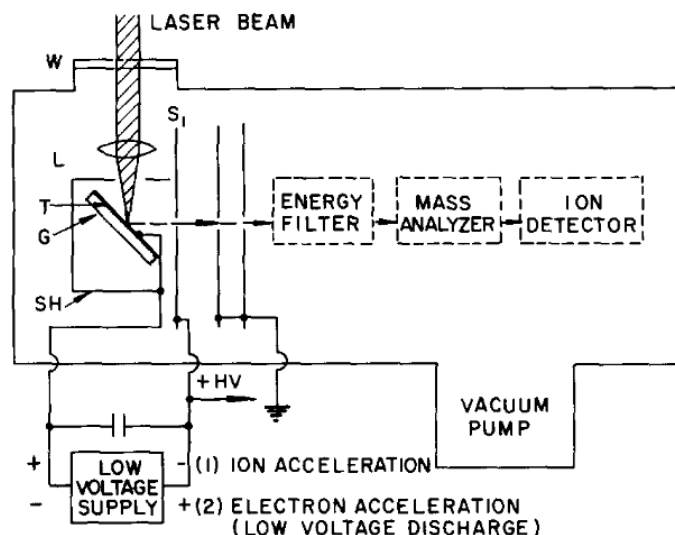


Figure 14 : Schéma du spectromètre de masse construit par Honig et Woolston [51].

II.1.2.b. Principe

La technique MALDI consiste à irradier avec un laser une surface constituée d'un analyte et d'une matrice qui absorbe à la longueur d'onde de l'émission laser. À la suite de cette irradiation, un phénomène de désorption/ionisation se produit. Les ions formés sont généralement sous forme protonée, cationisée, en mode positif, et de molécule déprotonée, en mode négatif.

II.1.2.c. Modèles de désorption/ionisation

Bien que la technique MALDI permette un grand nombre d'applications, le phénomène de désorption et d'ionisation n'est pas clairement établi. Plusieurs modèles proposent d'expliquer la désorption ou l'ionisation. Bien qu'il soit admis que le phénomène de désorption s'apparenterait plutôt à un processus d'ablation, le terme désorption a été conservé. L'énergie déposée par les photons est absorbée par la matrice *via* une excitation électronique (UV-MALDI) ou vibrationnelle (IR-MALDI). Ceci produit un échauffement de l'échantillon qui induit une sublimation du solide. La matière éjectée est appelée en anglais *plume* [62].

Différents modèles ont essayé d'expliquer l'ionisation en MALDI. Certaines équipes ont proposé que la matrice serait ionisée directement par les photons. Cependant, le potentiel d'ionisation d'une matrice conventionnelle est compris entre 7,5 et 9 eV alors que l'énergie des photons aux longueurs d'onde employées par un laser à 337 nm est de 3,7 eV. Cela implique qu'il faut au moins deux photons pour ioniser la molécule de matrice [63]. Les lasers employés ayant une faible irradianance, il est peu probable que deux photons puissent être absorbés par la même molécule de matrice. Il a alors été proposé que ce serait une redistribution de l'état d'énergie de deux molécules voisines qui permettrait la photoionisation [64].

Un autre modèle proposé par l'équipe de Karas est appelé *cluster model*. Ce modèle propose que les analytes soient déjà sous forme chargée dans le solide. Les contre-ions se séparent pendant le phénomène d'ablation. Ces derniers sont éjectés sous forme d'agrégats.

Dans le plume, les molécules de matrice se protonent et perdent un électron avant que les agrégats ne se désolvent. Ensuite, un échange de proton entre la matrice et les analytes se produit. Finalement les agrégats sont complètement dissous pour ne présenter qu'un ion moléculaire de l'analyte [64,65,66]. Ce modèle est schématisé en Figure 15.

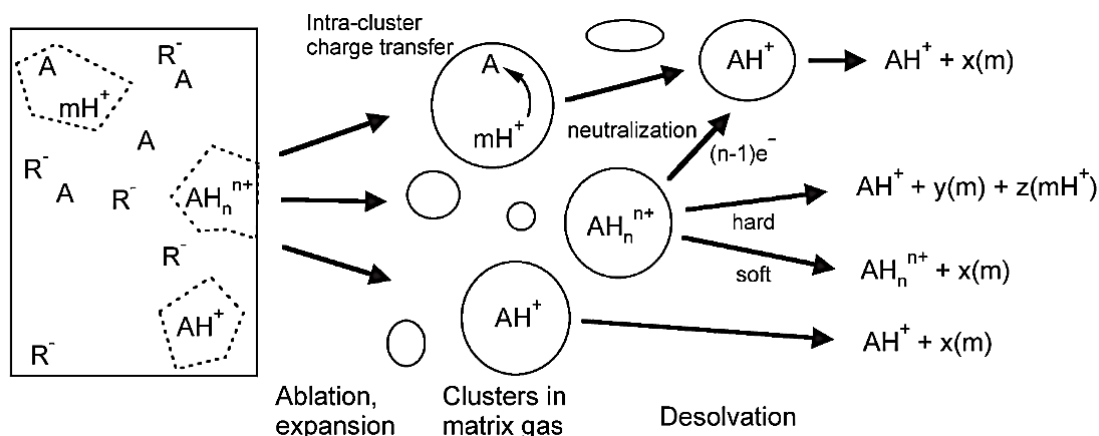


Figure 15 : Schéma décrivant le *cluster model* [64].

II.1.2.d. Amélioration du rendement d'ionisation

Malgré qu'il n'existe pas de modèle théorique permettant d'expliquer clairement le phénomène de désorption ionisation laser assisté par matrice, un certain nombre d'études ont permis d'apporter des connaissances pratiques pour l'optimisation des analyses en MALDI.

Par exemple, Soltwisch *et al.* ont montré que le rendement d'ionisation en MALDI dépend de l'absorption de la matrice en phase solide, la longueur d'onde et la fluence du laser mais aussi de l'affinité protonique de la matrice [67]. En employant un laser à longueur d'onde variable, pour un peptide A, le meilleur rendement d'ionisation $[A+H]^+$ est obtenu si la longueur d'onde du laser correspond au maximum d'absorption de la matrice. Pour une absorbance intermédiaire, il est possible d'obtenir le même rendement d'ionisation en augmentant la fluence du laser. L'affinité protonique des matrices a aussi été étudiée par cette équipe. Par exemple, les rendements d'ionisation de peptides mélangés à différents dérivés halogénés de l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique ont été comparés. Un gain de sensibilité a été observé lorsque l'affinité protonique de la molécule de matrice diminue. D'autres améliorations ont été effectuées au niveau des lasers. Les lasers à azote (337 nm) étaient moins onéreux et moins encombrants que les lasers à support solide comme les lasers Nd:YAG (triplé en fréquence, $\lambda = 355$ nm), et leur ont longtemps été préférés. Cependant, la fréquence des lasers à azote ne peut pas être augmentée sans perte de puissance au-delà de 20 Hz, et la durée de vie de leur cartouche d'azote est limitée. Les lasers Nd:Yag peuvent quant à eux atteindre une fréquence supérieure à 1 kHz (20 kHz dans un tout nouveau spectromètre commercial). De plus les lasers Nd:YAG ont aujourd'hui une durée de vie supérieure à celle des lasers à azote et leur compacité est aujourd'hui meilleure que celle des lasers à azote. Pour les besoins de l'imagerie, une haute fréquence et bonne durée de vie du laser sont nécessaires. En 2006, Holle *et al.* présentent leurs résultats où le profil du faisceau issu d'un laser Nd:YAG triplé a été modulé afin d'obtenir des performances analytiques similaires aux lasers à azote [68]. Cette modulation obtenue à partir d'un système breveté

d'interférences, permet de construire un profil de faisceau non gaussien, ce qui permet d'optimiser la désorption-ionisation des échantillons. Aujourd'hui ces lasers modulés sont commercialisés par Bruker sous le nom de Smartbeam-IITM.

II.1.3. L'analyseur à temps de vol

Les analyseurs sont des instruments permettant de mesurer le rapport masse-sur-charges des ions précédemment formés en phase gazeuse. Il existe plusieurs types d'analyseurs basés sur différents principes physiques. Les instruments utilisés lors de cette thèse sont tous équipés d'un analyseur à temps de vol.

II.1.3.a. Historique

Historiquement, les premiers spectrographes construits par Thomson et Aston employaient des champs magnétiques pour séparer les rayons cathodiques [3]. Le principe étant que le champ magnétique dévie les ions en fonction de leur rapport charge-sur-masse. Dans les années 30 émergent les premiers instruments combinant un champ électrique et magnétique afin de séparer les ions en fonction de leur énergie et de leur direction. En 1946, W. E. Stephens annonce la construction d'un analyseur reposant sur la mesure de « dispersion en temps » des ions [69]. Le schéma de cet instrument et les premiers résultats n'ont été publiés qu'en 1953 [70].

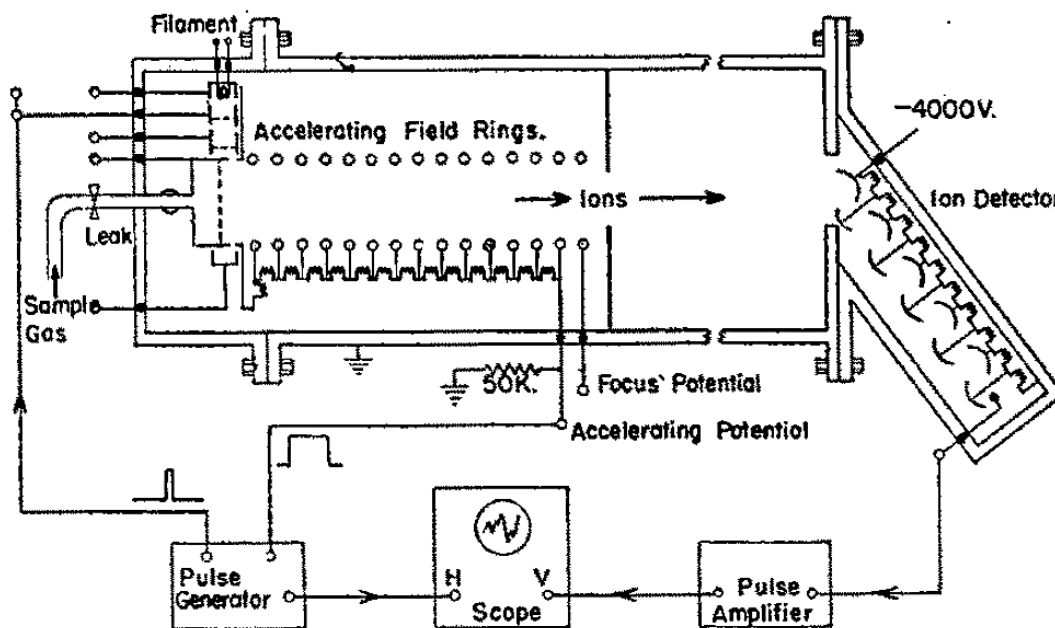


Figure 16 : Schéma de l'analyseur en masse construit par Stephens [70].

Entre temps, A. E. Cameron et D. F. Eggers, Jr. ont présenté un appareil appelé *ion velocitron*, qui était une source à impact électronique couplée avec un des premiers analyseurs à temps de vol (TOF) [71].

II.1.3.b. Description de l'analyseur à temps de vol

Il est basé sur un principe assez simple, des ions de rapport m/z différents, accélérés par un même champ électrique possèdent une énergie cinétique identique, mais des vitesses différentes. Il suffit donc de mesurer précisément le temps mis par un ion donné pour

parcourir une distance donnée pour remonter à son rapport m/z . Cet analyseur de masse nécessite une impulsion de départ afin de mesurer un temps de vol. [72]. Il est donc tout à fait adapté à des sources pulsées telle que la source MALDI ou la source SIMS.

Dans sa version la plus simple, l'analyseur par temps de vol linéaire, les ions sont accélérés par une différence de potentiel puis entrent dans une région libre de champs, le tube de vol, et sont détectés au niveau du détecteur (Figure 17 ci-dessous).

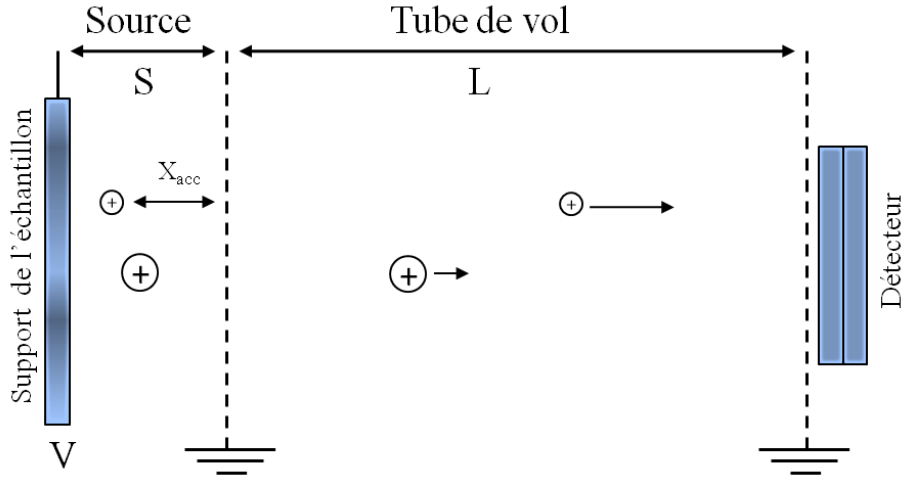


Figure 17 : Schéma de principe de l'analyseur par temps de vol linéaire.

Un potentiel V de quelques kilovolts est appliqué sur le support de l'échantillon. Une grille d'extraction, reliée à la masse, est placée à une distance S . Ainsi, un ion situé à une distance X_{acc} de la grille est soumis au champ électrique :

$$E = \frac{V}{X_{acc}} \quad \text{Équation 7}$$

Il en résulte une force qui peut s'écrire :

$$F = zeV = m \frac{d^2 X_{acc}}{dt^2} \quad \text{Équation 8}$$

On peut en déduire le temps t_{acc} , ou temps d'accélération, que l'ion mettra pour atteindre la grille d'extraction :

$$t_{acc} = 2X_{acc} \sqrt{\frac{1}{2eV} \frac{m}{z}} \quad \text{Équation 9}$$

Après l'espace d'extraction, l'ion pénètre dans le tube de vol où il n'est soumis à aucun champ et conserve donc l'énergie acquise durant la phase d'accélération. Son énergie cinétique correspond donc à :

$$E_c = \frac{mv^2}{2} = zeV \quad \text{Équation 10}$$

Ainsi :

$$v = \sqrt{\frac{2zeV}{m}} \quad \text{Équation 11}$$

En introduisant la longueur du tube de vol L , on peut calculer le temps t_L mis par un ion pour le traverser :

$$t_L = \sqrt{\frac{m}{2zeV}} \times L \quad \text{Équation 12}$$

Le temps total mis par l'ion pour parcourir la zone d'accélération et la région libre de champs étant égal à $t = t_{acc} + t_L$, on aura :

$$t = \sqrt{\frac{m}{2zeV}} \times L + 2X_{acc} \sqrt{\frac{1}{2eV} \frac{m}{z}} = (2X_{acc} + L) \sqrt{\frac{m}{2zeV}} \quad \text{Équation 13}$$

Avec cette relation, il est donc possible de calculer le rapport m/z d'un ion. Ainsi, après accélération, les ions « volent » d'autant plus vite qu'ils sont plus légers.

La résolution en masse de ce type d'appareil peut s'écrire comme suit :

$$\left. \begin{aligned} m &= \left(\frac{2ze}{L^2} \right) \times t^2 \\ dm &= \left(\frac{2zeV}{L^2} \right) \times 2t dt \end{aligned} \right\} \frac{m}{dm} = \frac{t}{2dt} \quad \text{Équation 14}$$

Donc :

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t} \quad \text{Équation 15}$$

Pendant le processus d'ionisation ou durant l'analyse, certains facteurs peuvent dégrader la résolution en masse. Ces facteurs sont : la durée de l'impulsion d'ionisation (t_0), la distribution en énergie cinétique initiale et la distribution des ions dans l'espace. Des ions isobares vont donc atteindre le détecteur à des temps légèrement différents, ce qui va élargir les pics sur le spectre de masse. Pour pallier à ces limitations, deux innovations majeures ont été mises au point : l'extraction retardée *delayed extraction* et le miroir électrostatique.

II.1.3.c. L'extraction retardée

En 1955, Wiley et McLaren ont réussi à regrouper les ions en temps en employant un retard d'extraction [73]. Le principe est illustré en Figure 18 sur le schéma d'un extracteur double étage. Premièrement, le support de l'échantillon est placé à la même tension que la grille d'extraction, les ions formés évoluent pendant un temps τ dans un espace qui est donc libre de champ. Après la période τ , une différence de potentiel est appliquée. Dans cette configuration, les ions ayant une plus grande vitesse d'éjection sont soumis à une différence de potentiel plus forte. Ainsi les ions ayant une plus grande énergie cinétique initiale sont moins accélérés que les ions plus lents. En effet les ions plus rapides sont soumis moins longtemps au potentiel d'extraction. Après ce regroupement en temps, les ions traversent la première grille d'extraction et sont ré-accelérés. Ce procédé permet une augmentation très importante de la sensibilité, de la précision de la mesure de masse et de la résolution, et équipe la plupart des instruments de type MALDI-TOF. Il a de plus été caractérisé et utilisé en TOF-SIMS dans le cadre de cette thèse (voir chapitre III)

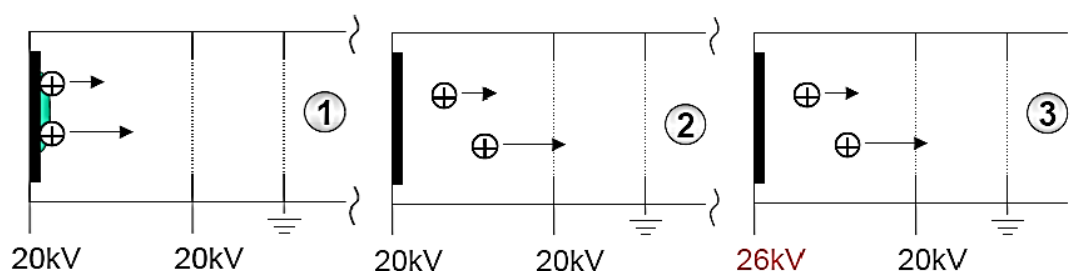


Figure 18 : Représentation schématique de l'extraction retardée.

II.1.3.d. Les miroirs électrostatiques

Au début des années 70, le groupe de Mamyrin a mis au point un dispositif appelé *reflectron* (miroir électrostatique en français) [74]. Celui-ci est composé d'une série d'électrodes portées à des potentiels croissants, générant ainsi un champ électrique uniforme. Les ions pénétrant dans le champ électrostatique sont repoussés et font demi-tour. Un schéma d'un réflectron est disponible en Figure 19. Ce système a deux avantages :

- Il permet d'augmenter le trajet des ions, ainsi une meilleure résolution peut être obtenue avec un encombrement moindre.
- Il permet de refocaliser en temps le faisceau ionique. Pour deux ions de même m/z mais d'énergies cinétiques différentes, l'ion le plus rapide pénétrera plus profondément le miroir qu'un ion ayant un déficit en énergie. Ainsi, l'écart de temps d'arrivée des ions est resserré.

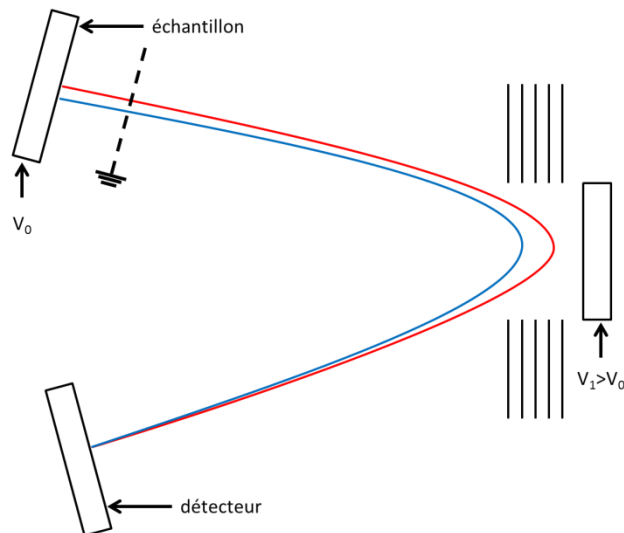


Figure 19 : Schéma simplifié d'un miroir électrostatique. Les courbes rouges et bleu représentent le parcours de deux ions au même m/z mais ayant des énergies cinétiques différentes.

Il existe plusieurs technologies de miroirs électrostatiques :

Le miroir électrostatique à un étage : Celui-ci est simplement constitué d'un champ électrostatique uniforme sur toute sa profondeur. Dans ce système, les ions produits traversent un premier espace libre de champ L_1 avant de pénétrer dans le réflecteur jusqu'à une distance d , appelé le point de rebroussement. À la sortie du réflecteur, les ions traversent à nouveau un espace libre de champ L_2 . En ignorant l'évolution des ions dans la zone d'extraction, leur temps de vol est calculé à l'aide de cette formule :

$$t = \left(\frac{m}{2eV} \right)^{1/2} [L_1 + L_2 + 4d] \quad (\text{Équation 16})$$

Le miroir électrostatique à deux étages : dans celui-ci un premier espace court, avec un fort champ électrostatique, décélère les ions des deux-tiers de leur énergie cinétique, puis un second espace plus profond avec un champ électrostatique moins fort est utilisé pour le rebroussement des ions. Ce système a surtout l'avantage d'être plus compact que le miroir à un seul étage, mais a l'inconvénient de nécessiter plus de grilles et a donc une moins bonne transmission.

Le miroir électrostatique parabolique : Ce type de miroir, dans lequel le potentiel augmente selon une parabole (avec le carré de la profondeur), est capable de compenser toute la gamme d'énergie cinétique des ions.

De nos jours les calculs modernes de trajectoire ionique permettent de concevoir des miroirs électrostatiques sans grilles, s'affranchissant ainsi des pertes de transmission qui leur sont dues, et ayant une optique d'entrée/sortie optimisée pour ne pas défocaliser les ions ni perturber le champ électrostatique qui règne à l'intérieur du miroir électrostatique.

II.1.4. L'analyseur TOF-TOF

Pour répondre aux besoins d'analyse structurale, aujourd'hui, les analyseurs à temps de vol sont généralement de type TOF-TOF. En pratique, les analyseurs de type TOF-TOF

sont le plus souvent constitués d'un premier temps-de-vol permettant de sélectionner une valeur unique de m/z , d'une cellule de collision contenant une certaine pression d'un gaz de collision inerte, et d'un second temps-de-vol permettant d'analyser les ions fragments (Figure 34). Dans la théorie, lors de la collision, une partie de l'énergie cinétique du gaz de collision E_{lab} (de masse m_G) peut être transférée à l'ion précurseur (de masse m). La quantité maximale d'énergie qui peut être convertie est appelée énergie au centre de masse E_{CM} et peut être calculée avec la relation suivante :

$$E_{CM} = E_{lab} \times \frac{m_G}{m_G + m} \quad \text{Équation 17}$$

Il est alors évident que plus la masse de l'ion précurseur est grande, moins la collision sera efficace. La manière la plus simple d'augmenter l'efficacité de la collision est alors d'augmenter la masse du gaz de collision, en utilisant par exemple de l'Argon à la place de l'air souvent utilisé [75].

II.1.5. Détection et traitement du signal

Une fois les ions séparés dans l'analyseur à temps de vol, ces derniers sont « convertis » en courant électrique par le détecteur. Le courant obtenu est ensuite amplifié pour être par la suite traité par procédés informatiques. Le détecteur employé dans le spectromètre de masse TOF-SIMS est une version hybride combinant une galette de microcanaux MCP pour *microchannel plates*, un scintillateur et un photomultiplicateur. Ce dispositif est moins sensible aux effets de saturations que le montage classique de deux galettes de microcanaux disposées en chevron.

Une galette de microcanaux, permet de convertir des ions en électrons (Figure 20). Ce dispositif est constitué d'un disque en verre d'environ 0,5 mm d'épaisseur recouvert d'un alliage de nickel capable d'émettre un électron à l'impact d'un ion. Le disque est percé et présente une multitude de microcanaux, d'environ 10 μm de diamètre, dont l'axe est incliné d'environ 8° par rapport à la normale, et espacés de 15 μm . Soumis à une forte différence de potentiel (~1 kV entre les deux faces), chaque canal se comporte comme une dynode de conversion continue. Chaque ion venant frapper la surface intérieure d'un canal entraîne l'émission d'un ou plusieurs électrons. À partir de cet impact commence une cascade d'impacts électroniques amplifiant le signal original de l'ordre de 10^3 pour un montage simple et jusqu'à 10^6 pour un montage de deux galettes en chevron [75].

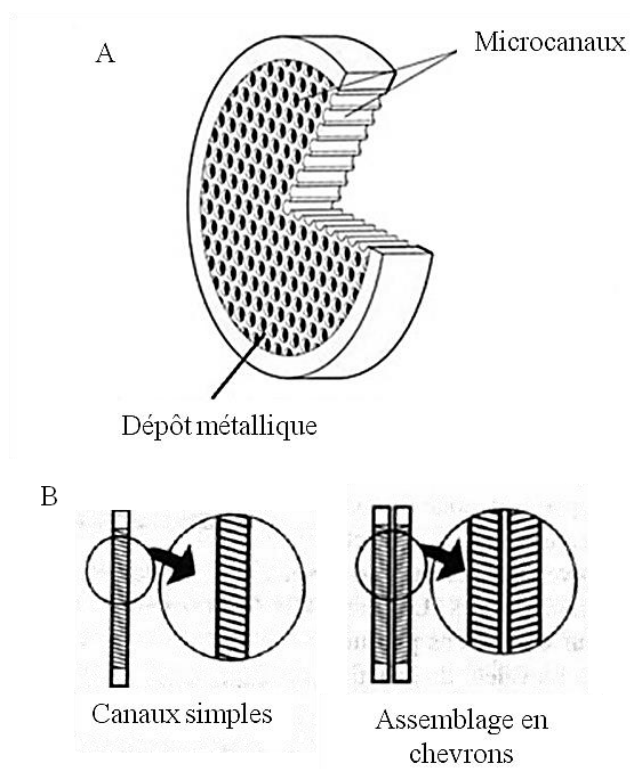


Figure 20 : A. Schéma représentant une galette de microcanaux. B. Deux types de montage : canaux simples et assemblage en chevrons.

En 1997, Brunelle *et al.* ont étudié le rendement d'électrons secondaires en bombardant une surface d'iodure de césium (CsI) recouverte d'un dépôt organique avec des ions de masse et d'énergie différentes [76]. La Figure 21 illustre le rendement d'émission d'électrons secondaires en fonction de la vitesse par unité de masse ou de la vitesse pour des projectiles différents. Il a été montré que le rendement de conversion ion/électron est dépendant de la masse et de la vitesse. Dans le spectromètre de masse TOF-SIMS, les ions secondaires n'ayant que 2 keV d'énergie, une tension de post-accélération de 10 kV est appliquée à l'entrée du détecteur afin d'optimiser l'efficacité de détection.

Le détecteur du TOF-SIMS est suivi d'un convertisseur temps-numérique TDC pour *time digital converter*, précédé d'un discriminateur à fraction constante, et dont le pas en temps est de 50 ps avec des temps morts d'environ 20 ns.

Le détecteur équipant le MALDI-TOF/TOF repose aussi sur l'émission d'électrons secondaires mais n'est pas de la même technologie que les galettes de micro-canaux. Le détecteur intégré au MALDI-TOF/TOF est appelé multiplicateur d'électrons et aussi *flash detector*. Le principe de ce détecteur est illustré en Figure 22, les ions bombardent une surface métallique et il en résulte l'émission d'électrons secondaires. Ces électrons secondaires sont par la suite extraits par un champ électrostatique et magnétique afin de les guider vers une série de dynodes [77]. Ce type de détecteur appelé FlashDetector s'apparente aux détecteurs de hautes masses de type HM développés par la société Coval-X [78] et réputés être plus efficaces que des montages à galettes de microcanaux pour des ions ayant des rapports masse-sur-charge supérieurs à quelques dizaines de milliers, voire centaine de milliers de Daltons.

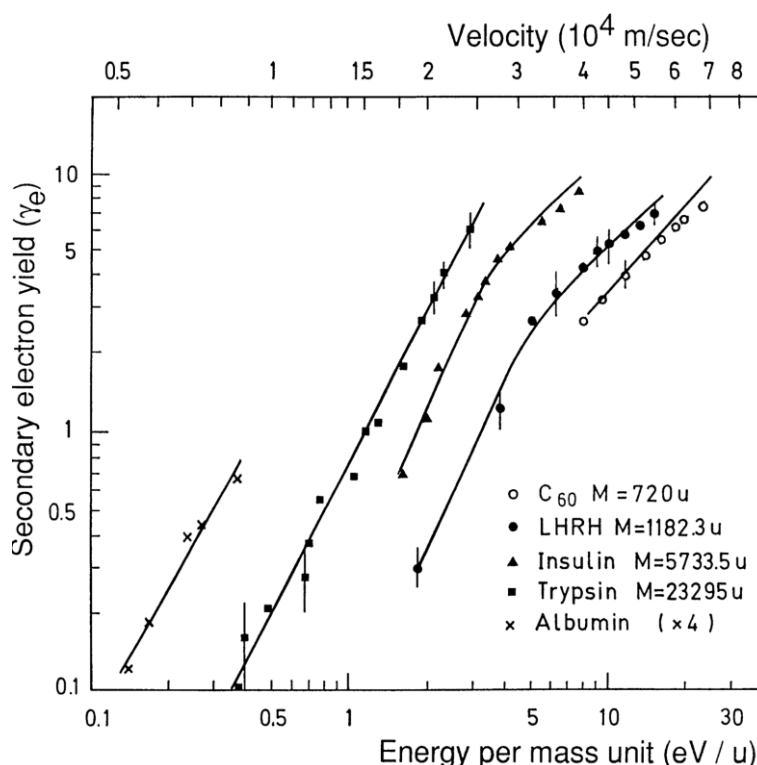


Figure 21 : Rendement d'émission électronique en fonction de l'énergie par unité de masse ou de la vitesse du C_{60} , L.H.R.H., de l'insuline humaine, d'une trypsine bovine et du l'albumine de sérum bovin sur une surface de CsI [76].

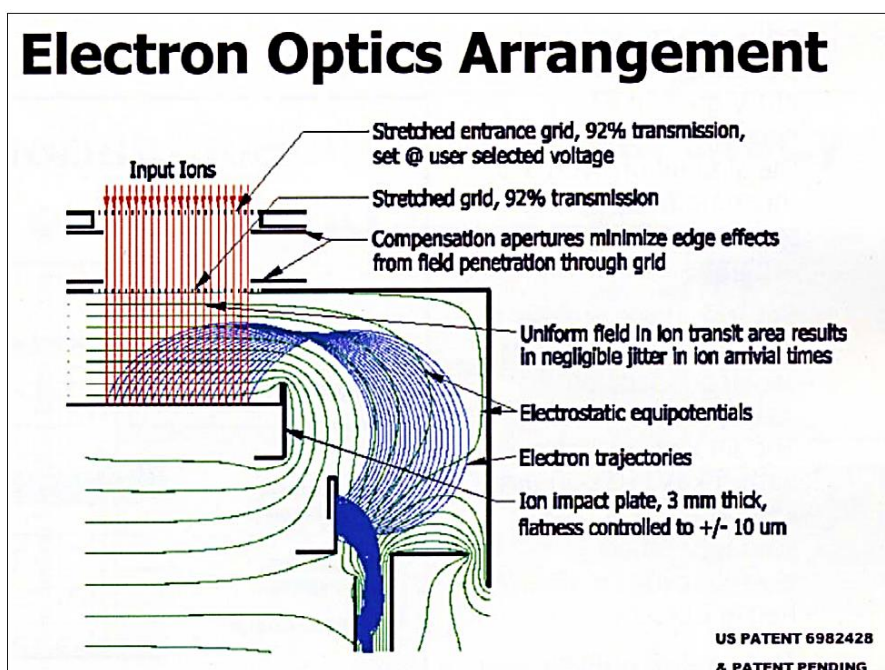


Figure 22 : Principe d'un détecteur multiplicateur d'électron [77].

Dans le cas du MALDI-TOF/TOF, le traitement du signal se fait par un digitaliseur. Ce système s'apparentant à un oscilloscope numérique, échantillonne le signal en mesurant la tension aux bornes d'une résistance placée à la sortie du détecteur. Le MALDI-TOF/TOF employé pendant cette thèse est équipé d'un digitaliseur ayant une fréquence d'échantillonnage de 4 GHz, soit un échantillonnage toutes les 250 ps.

II.1.6. L'imagerie TOF-SIMS

II.1.6.a. Principe et applications

Le principe de l'imagerie par spectrométrie de masse consiste à enregistrer la composition chimique d'une surface, en produisant des cartes de densité ionique. Celles-ci sont communément appelées des images par spectrométrie de masse. Historiquement les ions étaient sélectionnés par un analyseur magnétique puis refocalisés sur une plaque phosphorescente à l'instar d'un microscope. Une autre méthode qui est celle utilisée par nos instruments est celle de la microsonde ionique. Les pixels de la surface étudiée sont analysés individuellement et enregistrés en tenant compte de leur position. Ensuite, l'opérateur peut intégrer des pics, et reconstruire des images de densité ionique. Cette méthode permet d'obtenir autant d'images que d'ions détectés et ne nécessite pas la présélection d'un ou plusieurs ions. Cette technique est couramment employée pour l'analyse de matériaux notamment pour le contrôle qualité dans l'industrie des microprocesseurs. Cependant, depuis l'utilisation de faisceau d'ions primaires polyatomiques qui permettent d'améliorer le rendement d'émission ionique secondaire tout en gardant une résolution spatiale comprise entre 0,4 et 2 μm , cette technique est de plus en plus employée pour analyser des surfaces biologiques. Des pathologies telles que la stéatose hépatique non-alcoolique et la maladie d'Alzheimer ont été étudiées à l'aide de cette technique [79,80,81]. Dans le cas de la stéatose hépatique non-alcoolique, une accumulation de triglycérides et de diglycérides dans le foie a été mesurée avec l'apparition d'acide myristique ainsi que de cholestérol, localisé dans des vésicules lipidiques. L'étude sur la maladie d'Alzheimer a permis de mettre en évidence l'apparition de cholestérol dans des plaques bêta-amyloïdes. À l'aide de la très bonne résolution spatiale, l'absorption de médicament au sein de cellules a été effectuée à l'aide de cette technique [82]. Le TOF-SIMS permet aussi d'étudier simultanément la distribution de composés inorganiques et organiques. Cette capacité a été appréciée en cosmochimie où la distribution d'éléments organiques a été corrélée à des phases minérales sur des surfaces d'échantillon de météorites [83]. Dans cette étude, l'emploi d'un faisceau d'argon permet de supprimer la contamination de surface sans endommager les molécules organiques endogènes et de déterminer la composition minérale en profondeur tout en détectant les molécules organiques. Le TOF-SIMS a aussi été employé pour analyser des échantillons provenant d'objets du patrimoine culturel [84,85,86,87]. Par exemple, en 2011, Sanyova *et al.* ont analysé par TOF-SIMS une surface d'un échantillon prélevé sur le portrait de Nicolaes Van Bambeeck peint par Rembrandt van Rijn [87]. Cette étude a permis d'approfondir les connaissances sur la technique de l'artiste. Des grains d'amidon ont été détectés alors que cela n'avait jamais été référencé (Figure 23). L'imagerie TOF-SIMS a aussi été utilisée pour étudier des échantillons végétaux et des microorganismes : l'état de l'art de ces deux applications est disponible dans le chapitre d'application de l'imagerie par spectrométrie de masse aux substances naturelles (chapitre IV).

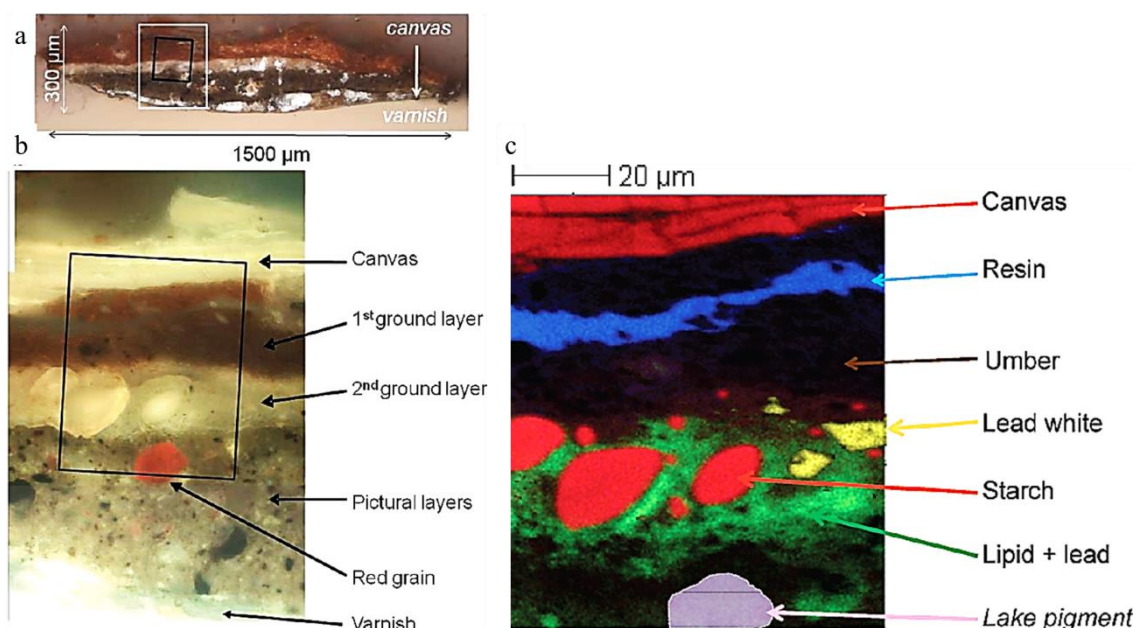


Figure 23 : Résultats de l'analyse d'un échantillon prélevé du tableau représentant le portrait de Nicolaes Van Bambeeck peint par Rembrandt van Rijn. a) Image optique de l'échantillon prélevé b) Image optique de l'échantillon exposé aux ultra-violets c) Superposition de plusieurs images montrant la localisation des différentes couches constituant l'échantillon [87].

II.1.6.b. Le couplage TOF-SIMS

Comme il a été décrit en II.1.1.a l'emploi d'une source SIMS pour construire une image ionique date des années 1960. Il a aussi été dit que Chait et Standing ont construit le premier TOF-SIMS, c'est-à-dire le premier couplage d'une source d'ions à un analyseur par temps de vol. La description et les performances de ce premier TOF-SIMS équipé d'un réflectron à un étage ont été publiées par cette même équipe, avec par exemple une résolution en masse de 10000 à m/z 625,5 pour l'ion $[(CsI)_2Cs]^+$ [88]. En 1991, Brunelle *et al.* décrivent un TOF-SIMS équipé d'un réflectron à deux étages [89]. L'intérêt d'un réflectron à deux étages permet de compenser de larges variations des tensions dans la zone d'extraction et d'obtenir des spectres de masse en analysant une surface isolante. Depuis, l'analyse structurale d'ions secondaires n'a quasiment pas été développée en TOF-SIMS. En 2006, Touboul *et al.* emploient sur un TOF-SIMS commercial une méthode de PSD pour *post-source decay* précédemment développée par Della-Negra et Le Beyec sur un couplage entre une source à désorption plasma et un temps de vol [90,91]. Plus récemment un autre TOF-SIMS équipé d'une cellule de collision a été développée à Manchester [92].

II.1.6.c. Intérêts et inconvénients du couplage TOF-SIMS

Le premier avantage de coupler un analyseur à temps de vol avec une source SIMS, est une bonne transmission des ions secondaires. De plus, les ions secondaires ayant une faible distribution en énergie cinétique initiale et grâce à la bonne précision et linéarité des convertisseurs temps-numériques, la relation entre la racine carrée du rapport masse sur charge et le temps de vol est linéaire. Cela permet d'étalonner le spectre de masse sur toute la gamme de masse étudiée avec des ions fragments de faible masse tels que H^+ ; H_2^+ ; H_3^+ ; C^+ ; CH^+ ; CH_2^+ ; $C_2H_3^+$ et $C_2H_5^+$ en mode positif et C^- ; CH^- ; CH_2^- ; C_2^- ; C_3^- ; C_4H^- en mode négatif. Malgré un tel étalonnage avec seulement des ions de faible masse, des ions ayant un

rapport masse-sur-charge supérieur à 1000 peuvent être mesurés avec une précision de seulement quelques ppm.

Du côté des inconvénients, le champ électrostatique destiné à l'extraction des ions secondaires modifie la trajectoire des ions primaires. Pour limiter ce problème, la différence de potentiel appliquée dans la zone d'extraction est limitée à quelques kilovolts, mais la distribution en énergie cinétique initiale des ions secondaires, ou encore les différences de temps dues à des défauts de planéité de la surface de l'échantillon, induisent des différences de temps de vol dont l'influence relative est d'autant plus grande que l'énergie d'accélération des ions secondaires est faible. Ceci limite donc par conséquence les performances de l'analyseur.

II.1.7. Le spectromètre de masse TOF-SIMS IV

L'instrument utilisé pendant cette thèse est un spectromètre de masse TOF-SIMS IV commercialisé par la société ION-TOF GmbH fondée en 1989 par Alfred Benninghoven, Eward Niehuis et Thomas Heller. Une photographie et un schéma de l'instrument situé à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles sont présentés en Figure 24. Le TOF-SIMS IV est équipé d'une source d'ions à pointe liquide délivrant des ions bismuth de type Bi_n^{q+} à une énergie de $25 \text{ q} \times \text{keV}$.

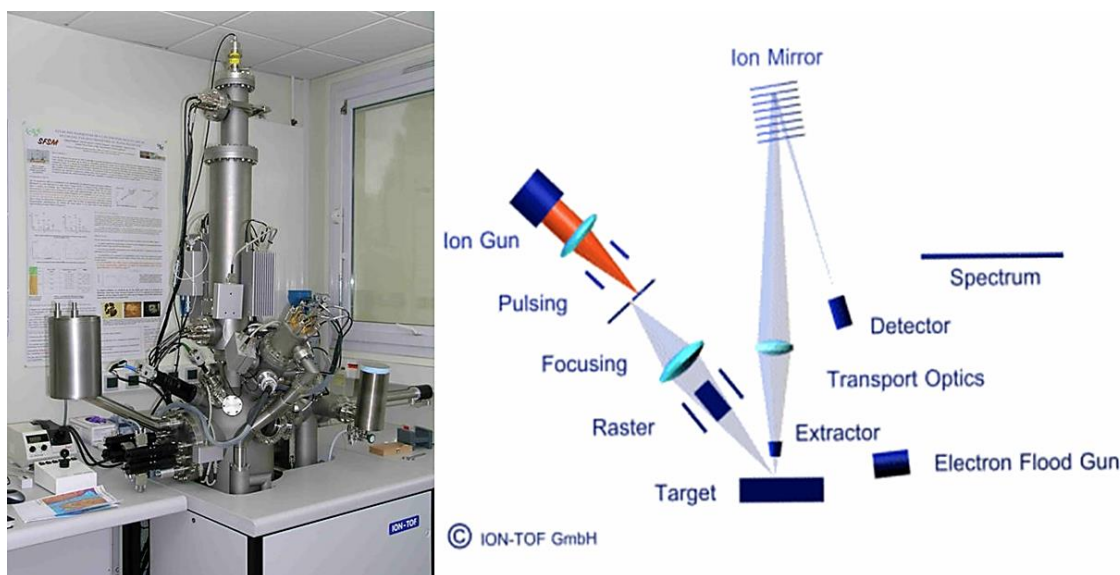


Figure 24 : Photographie et schéma du TOF-SIMS IV (photographie Copyright A. Brunelle et schéma Copyright Ion-TOF GmbH).

II.1.7.a. La source d'ions à pointe liquide

Différents types de sources d'ions existent comme les sources ECR *electron cyclotron resonance*, à impact électronique, à pulvérisation, et celle équipant notre instrument est appelée LMIG pour *liquid metal ion gun*. Son principe est basé sur l'émission de champ d'un métal à l'état liquide (Figure 25). Par effet Joule, le métal est chauffé sur une pointe de tungstène afin d'atteindre sa température de fusion. Ensuite, un cône de Taylor est formé par une différence de potentiel. Ce phénomène est accompagné par une ionisation du métal en phase gazeuse. Les ions sont principalement monoatomiques et mono-chargés mais pour des métaux tels que l'or ou le bismuth, des agrégats et des ions poly-atomiques sont formés mais

moins abondamment que les ions monoatomiques mono-chargés [93]. La grande majorité des sources d'ions à pointe liquide fonctionne de nos jours avec du bismuth. En comparaison avec l'or et le gallium qui était initialement plus utilisé l'utilisation du bismuth permet une plus forte brillance ainsi qu'une moindre température de chauffage grâce à une plus faible température de fusion du bismuth [94]. De plus, les agrégats de bismuth ont une plus faible distribution en énergie cinétique facilitant leur focalisation.

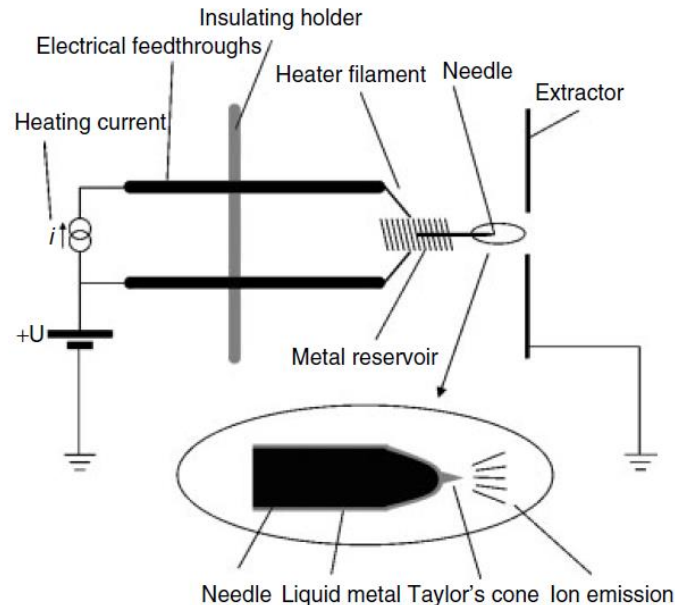


Figure 25 : Schéma d'une source à pointe liquide [94].

L'émetteur délivrant un faisceau continu contenant tous les ions à la fois, celui-ci est complété par une pulsation et un sélecteur en masse. Ce dispositif est une succession de deux plaques de déflexion appelé aussi double système de pulsation/sélection Figure 26) permettant de :

- Pulser le faisceau d'ion primaire en sélectionnant le temps de passage des ions à travers un diaphragme.
- Sélectionner la masse de l'ion primaire choisi en fonction de son temps de vol entre le premier et le second jeu de plaques. Le faisceau est dévié avant et après le passage de l'ion sélectionné.

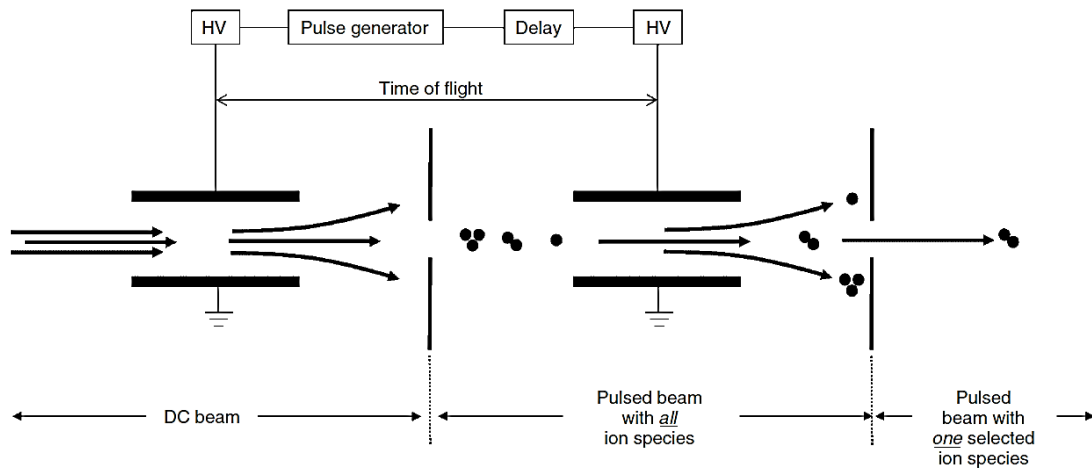


Figure 26 : Schéma d'un double système pulsation/sélection [94].

Les ions secondaires seront émis de la surface de l'échantillon pendant toute la durée des impulsions d'ions primaires. Plus la durée d'émission d'ions primaires est longue, moins la résolution en masse sera bonne. Or même si le système de pulsation peut produire des impulsions de courte durée, compatibles avec une bonne résolution en masse, la distribution en énergie cinétique des ions primaires conduit à des impulsions dont la durée serait, au niveau de la surface de l'échantillon, de plusieurs dizaines de nanosecondes. Les ions primaires sont donc regroupés en temps en employant un *buncher*. Dans ce système les ions ayant été émis en dernier sont plus accélérés que les ions émis en premier. Ainsi, le *buncher* permet de diminuer la durée d'impulsion des ions primaires à une valeur inférieure à la nanoseconde. Cependant son emploi nécessite aussi l'utilisation d'une lentille électrostatique de courte focale, incompatible avec une focalisation à moins d'un micron. De plus l'emploi d'un buncher augmente la distribution en énergie cinétique des ions, favorisant des aberrations chromatiques du faisceau et limitant sa focalisation. La Figure 27 schématise une aberration chromatique en optique ionique. Donc bien que ce système permette la meilleure intensité d'ions primaires, nous verrons par la suite qu'il n'est pas utilisé dans tous les cas. Nous avons en particulier caractérisé d'autres modes de fonctionnement (voir le chapitre III sur l'extraction retardée) qui permettent à la fois une bonne résolution en masse et une bonne résolution spatiale.

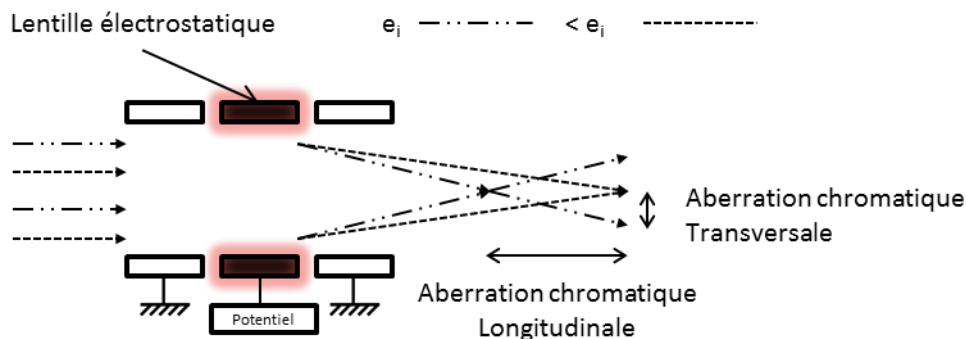


Figure 27 : Schéma d'une aberration chromatique due à des ions ayant des énergies cinétiques différentes.

II.1.7.b. Canon à électron

Lors de l'analyse d'une surface isolante par un faisceau d'ions, des charges sont créées à la surface et ne sont pas évacuées. Afin de neutraliser la surface, celle-ci est « inondée » par un flux d'électrons émis par un canon à électrons appelée *electron floodgun*. Ce système est constitué d'un filament chauffé à l'aide d'un courant de $\sim 2,5$ A. La tension appliquée sur le filament détermine l'énergie initiale des électrons qui sont par la suite extraits à l'aide d'une électrode [83]. Ce système nécessite d'utiliser une extraction pulsée. Lorsque la surface est bombardée par le faisceau d'ions primaires, le champ d'extraction est appliqué pendant quelques microsecondes pour extraire tous les ions à analyser. La différence de potentiel d'extraction est ensuite supprimée pour appliquer le bombardement d'électrons pendant une dizaine de microsecondes, puis réappliquée juste avant l'impulsion d'ions primaires suivante. En 2002, Gilmore *et al.* étudient la dégradation de la surface par le flux d'électron [95]. Ils montrent que l'utilisation d'électrons ayant une énergie de 10 à 20 eV est suffisante pour dégrader des polymères. Lors de cette étude, des recommandations sur l'utilisation du canon à électrons ont été indiquées. La Figure 28 montre la densité de courant en électron ou fluence en fonction de la densité d'ions primaires ou de la surface bombardée par le faisceau d'ions primaires ayant un courant de 1 pA pendant 100 s. La ligne horizontale représente la fluence limite d'électrons pouvant endommager la surface. Il est recommandé de garder une fluence en électron inférieure à 6×10^{18} électrons·m⁻² pour éviter l'endommagement de la surface. Cependant, la dose en électrons doit être 30 fois supérieure à la dose d'ions primaires pour maintenir une neutralisation des charges.

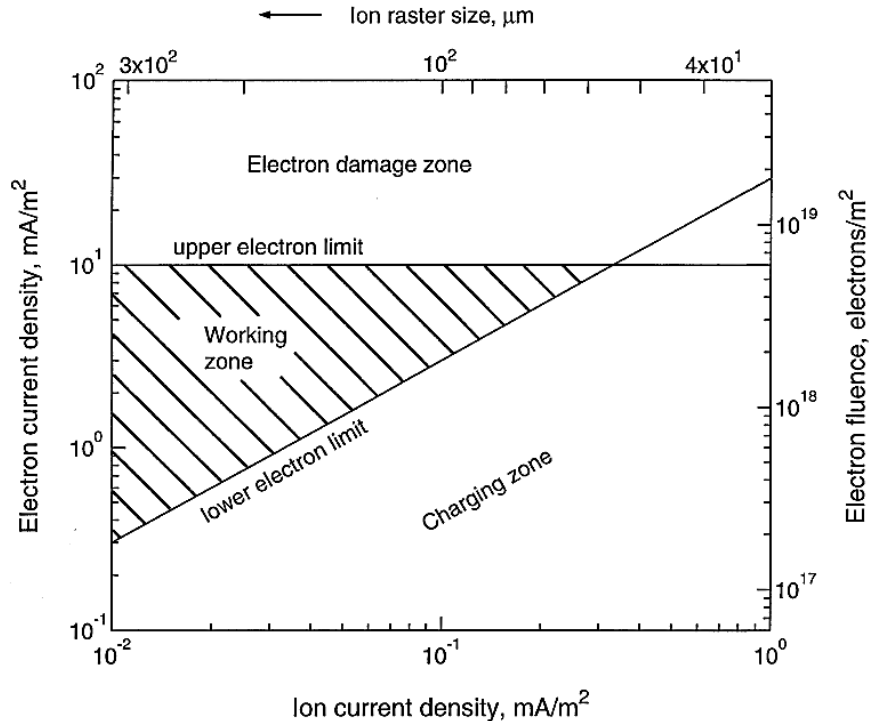


Figure 28 : Densité de courant d'électrons ou fluence en fonction de la densité d'ions primaires ou de la surface bombardée par le faisceau d'ions primaires ayant un courant de 1 pA pendant 100 s [95].

II.1.7.c. Analyseur

L'analyseur à temps de vol équipant le spectromètre de masse TOF-SIMS IV est muni d'une extraction retardée, d'un miroir électrostatique à un étage et sans grilles, et d'un détecteur hybride, MCP, scintillateur et photomultiplicateur. L'ensemble est schématisé en Figure 29. La zone d'extraction est de 1,5 mm dans les conditions normales, la tension d'accélération est de 2 kV. Le faisceau d'ions secondaires est ensuite focalisé vers le détecteur par une lentille électrostatique. Afin de centrer le faisceau sur le détecteur, un module composé de plaques de déflexion est situé après la lentille. La seconde électrode du miroir électrostatique dispose d'une tension ajustable, appelée VDP pour *variable drift path* VDP permettant d'ajuster finement la focalisation en énergie du miroir électrostatique tout en maintenant la focalisation temporelle sur le plan du détecteur pour une résolution en masse optimale.

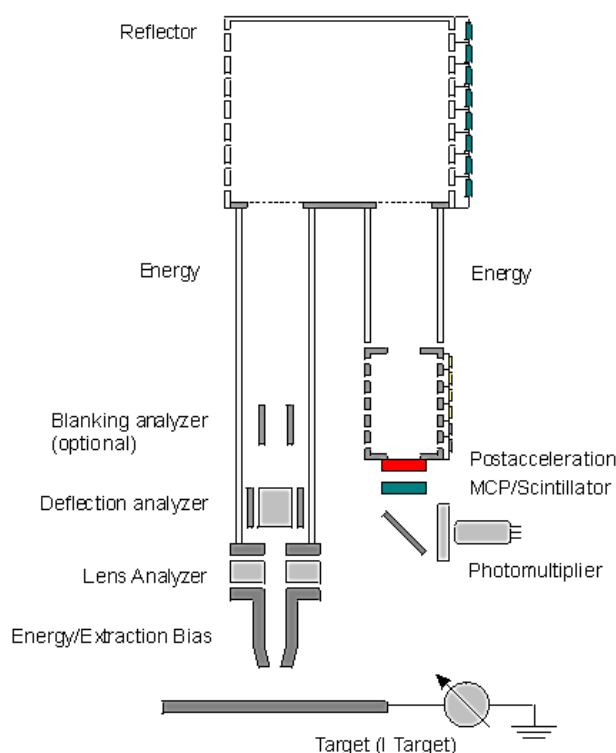


Figure 29 : Schéma de l'analyseur à temps de vol équipant le spectromètre de masse TOF-SIMS IV (Cette figure provient des fichiers d'aide du logiciel du constructeur).

II.1.7.d. Modes d'acquisition

Le spectromètre de masse TOF-SIMS IV a l'intérêt d'avoir de nombreux modes d'acquisition différents. Il permet d'analyser des petites ou de larges surfaces, avec différents mode de focalisation des ions primaires qui permettent d'obtenir soit une bonne résolution en masse soit une bonne résolution spatiale. L'analyseur permet aussi de modifier le mode d'extraction des ions secondaires pour améliorer la résolution en masse. Les paragraphes suivants décrivent comment le faisceau d'ions primaires balaye la surface à analyser, et comment modifier les paramètres d'acquisition pour optimiser l'analyse.

Le balayage de la surface à analyser

Deux méthodes différentes permettent de balayer la surface à analyser par le faisceau d'ions primaires. La première consiste à dévier le faisceau pixel par pixel à l'aide de plaques

de déflexions sur un échantillon statique. Ces plaques sur lesquelles des basses tensions très précises sont appliquées permettent de modifier la trajectoire des ions. Sachant la valeur des basses tensions, le spectre de masse est enregistré avec des coordonnées x,y connues. Ce mode d'acquisition est appelé *beam scan*. Avec ce mode, la résolution spatiale est limitée seulement par le diamètre du faisceau. La taille de pixel doit donc être choisie en fonction de ce paramètre qui peut être mesuré. La mesure du diamètre du faisceau est détaillée dans le chapitre III. L'angle d'incidence du faisceau d'ions primaires est de 45° par rapport à la normale à la surface analysée. Par cette méthode, la taille maximale des images est de $500\text{ }\mu\text{m} \times 500\text{ }\mu\text{m}$. cette limite correspond à peu près au champ de l'optique d'extraction des ions secondaires. Lorsqu'il est nécessaire d'enregistrer des images de plus grande taille, le logiciel permet d'enregistrer en déplaçant pas à pas le porte-échantillon une série de « patchs » individuels, chacun ayant une surface maximale de $500\text{ }\mu\text{m} \times 500\text{ }\mu\text{m}$, puis de reconstituer une image globale, mosaïque constituée de l'assemblage des images individuelles. Il est possible dans ce cas d'enregistrer des images rectangulaires ou carrées. Cette méthode est appelée le *stage scan*.

High Current Bunched (HCBU) mode

Ce mode d'acquisition correspond à l'utilisation d'un *buncher* précédemment décrit pour regrouper en temps les ions primaires lors de leur arrivée sur la surface de l'échantillon. Ce mode est celui qui permet d'obtenir le courant d'ions primaires le plus important. Il présente les avantages d'obtenir une résolution en masse élevée (~ 5000) et d'un temps d'analyse relativement court. Cependant, ce mode d'acquisition ne permet pas de bien focaliser les ions, le diamètre du faisceau étant d'environ $3\text{ }\mu\text{m}$.

Burst Alignment (BA) mode

Le mode burst alignement n'emploie pas de *buncher* et seules deux lentilles électrostatiques sont employées pour focaliser les ions primaires contre trois en mode HCBU. Le diamètre du faisceau est de quelques centaines de nanomètres. En revanche la durée des impulsions des ions primaires est de plusieurs dizaines voire plusieurs centaines de nanosecondes, ce qui limite la résolution en masse, et le courant d'ions primaires est plus faible qu'en mode HCBU .

Collimated mode

Dans ce mode les ions primaires ne sont plus focalisés que par une seule lentille électrostatique, et le faisceau rencontre sur son trajet deux collimateurs dans la colonne ionique. Le résultat est qu'on obtient un faisceau de très petit diamètre ($\leq 100\text{ nm}$) mais de très faible intensité, quasiment inutilisable avec des agrégats.

Burst mode

Le mode burst modifie les paramètres de pulsation des ions primaires. La pulsation des ions primaires est « hachée » en plusieurs impulsions d'une durée d'une nanoseconde chacune, permettant ainsi une bonne résolution en masse, au prix d'intensités très limitées. Ce mode d'extraction des ions secondaires ne s'applique qu'aux modes *burst alignment* et *collimated mode*, et de plus ne peut être utilisé que pour étudier des ions secondaires de

faibles masses et des spectres de masse relativement simples, car sinon les différents spectres générés par chacune des impulsions se chevauchent et ne sont pas interprétables.

Les modes HCBU, BA et Burst sont illustrés dans la figure suivante extraite d'une publication de Rana Sodhi [96].

Les caractéristiques des modes HCBU et BA sont détaillées dans le chapitre sur l'étude de l'extraction retardée.

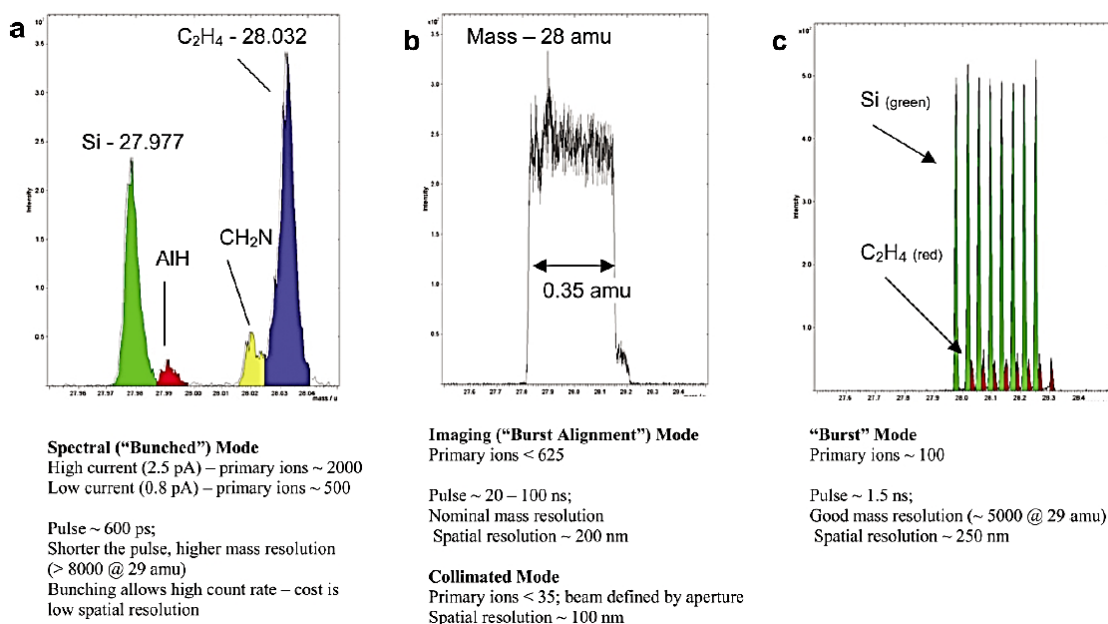


Figure 30 : Exemples de spectres de masse obtenus respectivement avec les modes HCBU (a), BA (b) et Burst (c) [96].

II.1.8. L'imagerie MALDI

L'utilisation d'une source MALDI pour des applications en imagerie a été présentée d'abord par le groupe allemand de Bernhard Spengler et Raimund Kaufmann à la conférence de l'*American Society for Mass Spectrometry* en 1994 [97,98], puis par le groupe américain de Richard M. Caprioli en 1997 [99]. La Figure 31a montre l'image ionique du potassium d'un dépôt d'érythrocyte (globule rouge) obtenue par Spengler et la Figure 31b montre l'image ionique d'un fragment de la protéine IB-1 à m/z 7605, provenant de muqueuse buccale humaine.

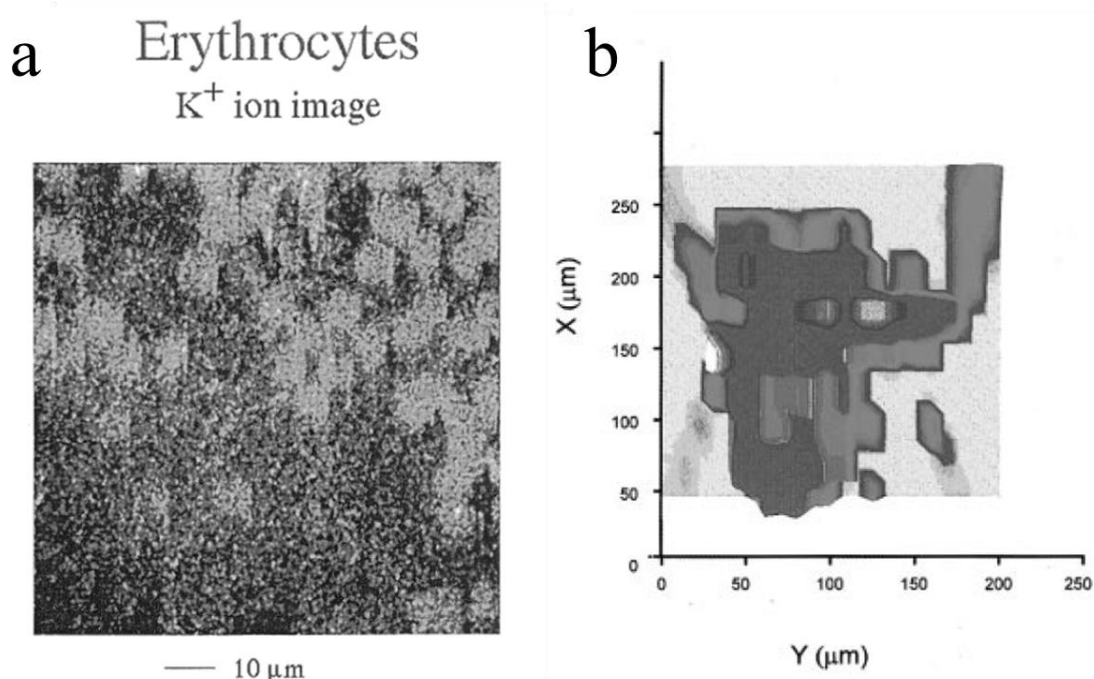


Figure 31 : Premières images MALDI. Distribution du potassium sur un dépôt d'érythrocytes (a) et image ionique de la protéine IB-1 à m/z 7605 provenant de muqueuse buccale de humaine (b) [97,98,99].

Par la suite, Stoeckli *et al.* ont montré la détection des protéines différemment exprimées à travers un tissu humain comprenant des parties saines et malades [100]. En 2004, Touboul *et al.* publient les premières images ioniques correspondant à la distribution de lipides à la surface de coupes de muscles de souris modèles de la dystrophie musculaire de Duchenne [101]. Depuis, cette technique a pris de plus en plus d'intérêt dans l'étude de pathologies sur des tissus animaux, principalement des mammifères (rats et souris) [102]. L'imagerie MALDI est aussi employée pour étudier des échantillons végétaux, ou encore des insectes [103,104].

Depuis ses débuts, les méthodes et l'instrumentation en imagerie MALDI se sont beaucoup améliorées. Pour résumer la situation au début, les spectromètres de masse étaient équipés de lasers à azote dont la fréquence de répétition ne dépassait pas 20 Hz, les dépôts de matrice étaient effectués manuellement et il n'y avait pas de logiciel automatisant l'acquisition de données, et quasiment aucun logiciel de traitement des données [105]. Les seules matrices utilisées étaient l'acide sinapinique, l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) et l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB), c'est-à-dire les trois matrices historiquement les plus utilisées en MALDI. Aujourd'hui en 2015, les spectromètres de masse MALDI dédiés ont des lasers pouvant tirer avec un taux de répétition de 2 kHz ; voire même 10 kHz pour un appareil qui vient juste d'être présenté cette année à la conférence de l'ASMS. Ils sont munis de logiciels dédiés pour automatiser l'acquisition des données. De nombreux travaux ont été effectués pour rendre efficaces et reproductibles les dépôts de matrice, et des méthodes aussi variées qu'originales ont été essayées. L'adjectif « efficace » est employé ici au sens de produire un dépôt de matrice qui permette la désorption du plus grand nombre possible de molécules caractéristiques de l'échantillon, avec la moindre délocalisation possible. Aujourd'hui la majorité des laboratoires utilise soit un automate de

pulvérisation de fines gouttelettes de matrice (sprayers), soit des systèmes simples de sublimation [106,107]. Dans notre laboratoire nous utilisons un robot sprayer TM-Sprayer, de la société HTX-Imaging, qui sera décrit dans le paragraphe suivant. Dans un article récent d'Erin Gemperline *et al.* [108], trois méthodes très utilisées de dépôt de matrice ont été comparées, en déposant les matrices DHB et CHCA sur une plante et en s'intéressant à des métabolites endogènes. Les trois méthodes étaient un sprayer (TM-Sprayer), un aérographe, et la sublimation. Dans tous les cas, le sprayer et la sublimation ont tous les deux conduit à des résultats très reproductibles et un grand nombre de métabolites désorbés et détectés, avec aussi une très bonne résolution spatiale. En ce qui concerne les matrices, nous utilisons généralement la CHCA pour analyser en mode positif les lipides, et la 9-aminoacridine pour analyser les lipides en mode négatif [109], mais le 1,5-diaminonaphtalène (DAN) serait une excellente alternative en sublimation, et fonctionne très bien pour analyser les lipides dans les deux polarités [106]. Dufresne *et al.* ont publié une méthode de désorption laser (ce n'est pas du MALDI au sens propre) consistant à déposer par pulvérisation une fine couche d'argent à la surface de l'échantillon, permettant d'augmenter le rendement d'ionisation de nombreux lipides, en particulier des espèces comme les acides gras ou le cholestérol, qui sont difficilement analysés avec les matrices classiques [110]. De plus, la résolution spatiale de cette méthode n'est limitée que par la taille du faisceau laser.

Pour l'analyse de tissus de petite taille comme des biopsies, l'échantillon nécessite d'être préalablement enrobé pour pouvoir être manipulé aisément. Il existe plusieurs enrobants comme la colle OCT (*optimal cutting temperature*), la CMC (carboxyméthylcellulose), des polymères ou encore la gomme adragante. La colle OCT est à proscrire en MALDI car ses constituants (alcool polyvinylique et polyéthylène glycol) induisent une suppression du signal. De plus, une migration des analytes peut être parfois constatée.

En 2006, Sugiura *et al.* ont montré que plus la section d'une coupe de cerveau de rat est fine, plus l'intensité et le rapport signal sur bruit est amélioré [111]. Suite à cette étude, il a été admis que l'épaisseur de l'échantillon pourrait influencer sur l'accumulation de charges à la surface de l'échantillon [112].

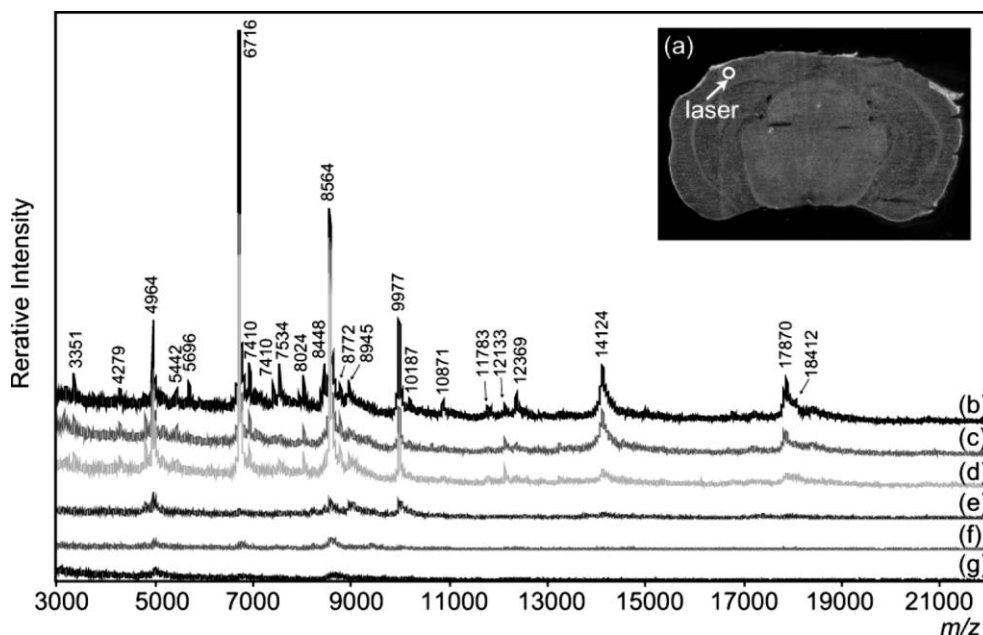


Figure 32 : Image d'une coupe de cerveau de rat (a). Spectre de masse MALDI de section de cerveau de rat à différentes épaisseurs 2 (b), 5 (c), 10 (d), 15 (e), 30 (f) et 40 μm (g).

II.1.8.a. Dépôt de matrice avec le robot TM-SprayerTM

Dans notre laboratoire, le dispositif permettant de déposer la matrice pour les expériences en imagerie est un TM-SprayerTM. Cet instrument est un automate permettant de déplacer un élément appelé « nez », inspiré des aérographes. Celui-ci va balayer régulièrement la surface de l'échantillon. À l'aide d'une pompe isocratique, une solution de matrice rejoint à un débit contrôlé un flux d'azote comprimé et chauffé. La matrice est alors pulvérisée (spray) en fines gouttelettes sur la surface destinée à l'analyse MALDI. Afin de maîtriser la proportion solvant/matrice, la taille des cristaux de matrice et la quantité de matrice, le débit de la pompe isocratique, du flux d'azote, la température du « nez » et la vitesse de déplacement de l'automate sont contrôlables. Contrôlé par un logiciel très simple d'utilisation, cet appareil robuste permet de faire très rapidement des dépôts de matrice de façon fiable et reproductible.

II.1.8.b. Le spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme

Le spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF utilisé pendant cette thèse est un UltrafleXtreme commercialisé par la société Bruker Daltonics GmbH. Cet instrument est équipé d'un laser ND:YAG 355 nm (3^{ème} harmonique) de technologie Smartbeam-IITM. La puissance du laser est atténuable et la fréquence des impulsions peut atteindre 2 kHz. La focalisation du faisceau laser à la surface de l'échantillon est variable de 70 à 10 μm (valeurs annoncées par le constructeur).

Le porte échantillon est placé sur un support mobile permettant de se déplacer sur les axes x et y . La Figure 33 montre le schéma de la source MALDI et de la zone d'extraction à l'entrée de l'analyseur par temps de vol. L'extraction consiste à placer la plaque MALDI à un potentiel P1. Le même potentiel est porté sur l'électrode P2, tel que $P2=P1$. L'analyte est donc placé dans un espace libre de champ avant le tir laser. Après le tir laser, les ions ne sont pas formés en même temps, ni tous dans le même plan, et ont une vitesse initiale de $\sim 500\text{--}700\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. Ces ions avancent dans l'espace libre de champ et se rapprochent de l'électrode P2

qui est ensuite portée à un potentiel $P2=P1/2$. Les ions les plus rapides sont plus éloignés de la surface donc moins longtemps accélérés que les ions ayant une énergie cinétique plus faible. Ensuite, les ions sont à nouveau accélérés par une électrode reliée à la terre. Ce système d'extraction retardée à deux étages est appelé par le constructeur PANTM pour *PANoramic mass resolution*, et permet la focalisation des ions à l'entrée du réflectron.

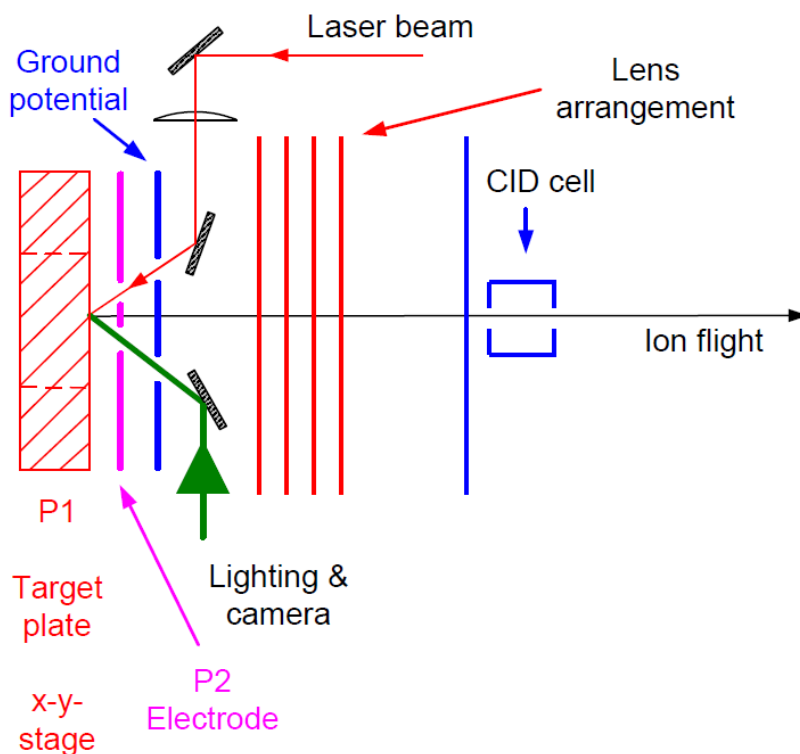


Figure 33 : Schéma du système d'extraction des ions à l'entrée de l'analyseur TOF équipant le spectromètre de masse UltrafleXtremeTM. Ce schéma provient de la notice d'utilisation de l' UltrafleXtremeTM.

Le spectromètre de masse UltrafleXtremeTM est muni d'un système permettant de réaliser des analyses en tandem. Pour ce faire, la fluence du laser est augmentée afin d'augmenter l'énergie interne des ions secondaires, les ions sont décélérés de 20 keV à 8 keV, et du gaz de collision (argon) peut être introduit dans une cellule située après la zone source. Les ions ainsi fragmentés sont ensuite sélectionnés en temps par une « porte électrostatique » (ce sont des plaques de déflexion qui ne laissent passer que les ions que pendant un temps donné) à l'entrée du système LIFT appelée PCIS pour precursor Ion Selector (voir schéma dans la Figure 34). Le système LIFT ré-accélère ensuite les ions fragments afin de réduire leur gamme d'énergie cinétique et de pouvoir les focaliser temporellement avec le miroir électrostatique. Il y a aussi une autre porte électrostatique après le système LIFT appelée PLMS pour Post Lift Metastable Suppressor, dont le rôle est d'éliminer tout ion qui se serait fragmenté dans ou après celui-ci.

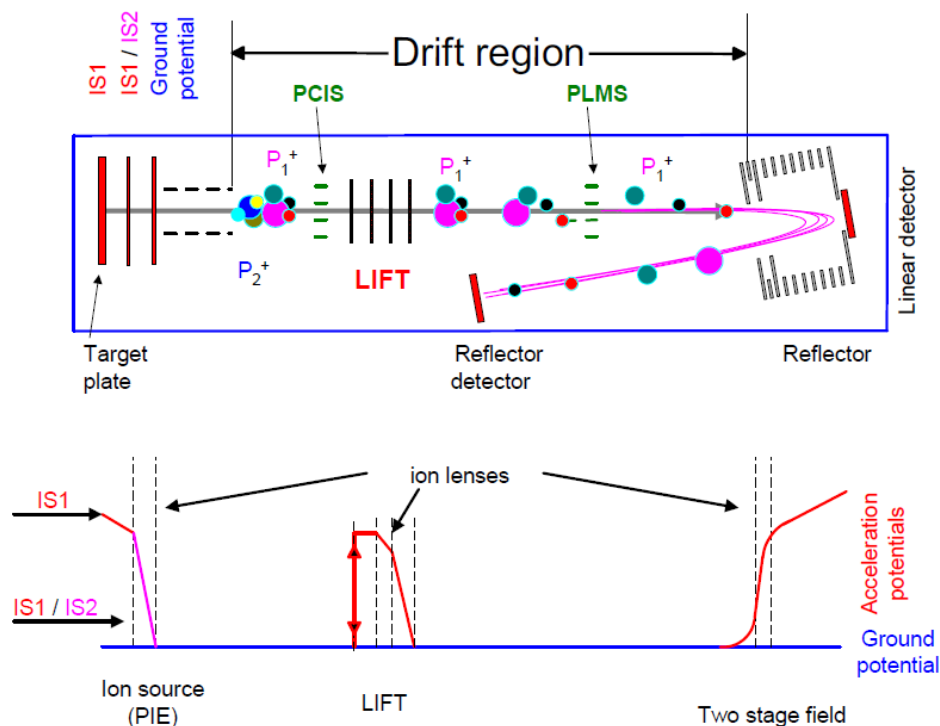


Figure 34 : Schéma du système LIFT. Ce schéma provient de la notice d'utilisation de l'UltrafleXtreme™.

Enfin l'analyseur par temps de vol est équipé d'un miroir électrostatique sans grille à deux étages.

II.1.9. Les logiciels de retraitement

II.1.9.a. Surface Lab 6

Surface Lab 6 est la suite de logiciel de contrôle, d'acquisition et de retraitement du spectromètre de masse TOF-SIMS développée par ION-TOF GmbH. La partie faisant interface entre l'ordinateur et l'instrument permet de déplacer le porte échantillon, les paramètres d'acquisition, mesurer le courant d'ions primaires, etc... Lorsqu'une acquisition est lancée, le logiciel crée un fichier ayant une extension .itm pour « ion tof measurement ». La Figure 35 montre l'organisation des données pour le logiciel Surface Lab 6. Le fichier .itm contient tous les paramètres d'acquisition, c'est le fichier brut de l'acquisition (fichier « raw »). Il contient tous les spectres référencés avec leurs coordonnées x,y. Le faisceau d'ions primaires pouvant balayer la surface plusieurs fois, le logiciel incrémente tous les spectres scan après scan. Cela permet par la suite de reconstruire l'acquisition pour un certain nombre de balayages voulus. Il est aussi possible d'ajouter une image optique, par exemple préalablement enregistrée à l'aide d'un microscope optique et d'ajouter celle-ci dans le fichier. De plus, il est aussi possible d'aligner celle-ci sur l'image vidéo de l'instrument. Les fichiers utilisés pour le retraitement des données sont distincts et ont pour extension .ita pour « ion tof analysis ». Ce fichier permet de travailler sur les spectres, images et profils et de les exporter sous format .its pour « ion tof spectrum », .iti pour « ion tof image » et .itp pour « ion tof profile ». Les retraitements et analyses sont réalisés par le logiciel *Measurement Explorer*, avec les modules *spectra*, *images* et *profiles*, tous inclus dans la suite Surface Lab 6.

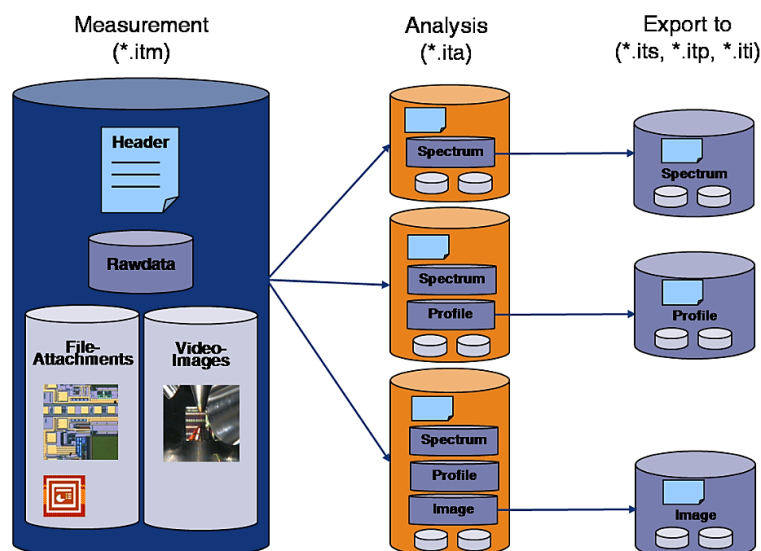


Figure 35 : Schéma de l'organisation des données d'une acquisition TOF-SIMS. Cette figure provient des fichiers d'aide du logiciel du constructeur.

Measurement Explorer - Spectra

Le logiciel Surface Lab 6 permet d'étalonner les spectres, de rechercher et de comparer le spectre acquis avec celui d'une bibliothèque, de mesurer la largeur du pic à mi-hauteur (en nanosecondes), la résolution en masse à mi-hauteur (FWHM pour *full width at half maximum*), d'annoter un spectre à une formule chimique pour déterminer l'erreur standard en ppm. Une des fonctions essentielles est la sélection de pics d'intérêt pour en extraire des images. Une autre option est la correction de Poisson : C'est une méthode de correction des spectres permettant de corriger l'aire des pics en prenant en compte le fait que le discriminateur, qui est un module électronique située entre le détecteur et le convertisseur temps-numérique, ne peut pas détecter plus d'un ion d'une masse donnée à chaque impulsion d'ion primaire. Comme la distribution d'émission ionique suit la loi statistique de Poisson, l'aire des pics peut être corrigée par la formule suivante [83] :

$$A_{\text{corr}} = -N \cdot \ln \left(1 - \frac{A_{\text{Exp}}}{N} \right) \quad \text{Équation 18}$$

Avec A_{corr} : L'aire corrigée, A_{Exp} : L'aire mesurée et N : Le nombre d'impulsions d'ions primaires. Cette correction est valable tant que les intensités des ions ne sont pas trop importantes, en pratique inférieures à 0,5 ion par impulsion d'ion primaire.

Measurement Explorer - Images

La Figure 36 montre un exemple d'image ionique TOF-SIMS. Celle-ci a été acquise à la surface d'une coupe de cervelet de rat. Une barre d'échelle indique les dimensions de l'image. Cette image représente en couleur, pour un ion sélectionné, son intensité sur toute la surface. Les couleurs bleue et magenta représentent des pixels peu intenses, là où peu d'ions ont été détectés, contrairement à la couleur jaune qui représente des pixels où plus d'ions ont été détectés. La première ligne correspond au rapport masse sur charge de l'ion, ici m/z 299,08 ainsi que sa formule brute $[\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_9\text{P}]^-$. La seconde ligne indique la nature de

l'ion détecté. La troisième ligne présente les valeurs du MC pour *max count*, qui correspond à l'amplitude de l'échelle d'intensité, c'est-à-dire la valeur du pixel le plus intense, ainsi que le *total count* (TC) qui est le nombre de coups pour toute l'image. La valeur du *total count* correspond aussi à l'aire du pic sélectionné pour la reconstruction de l'image.

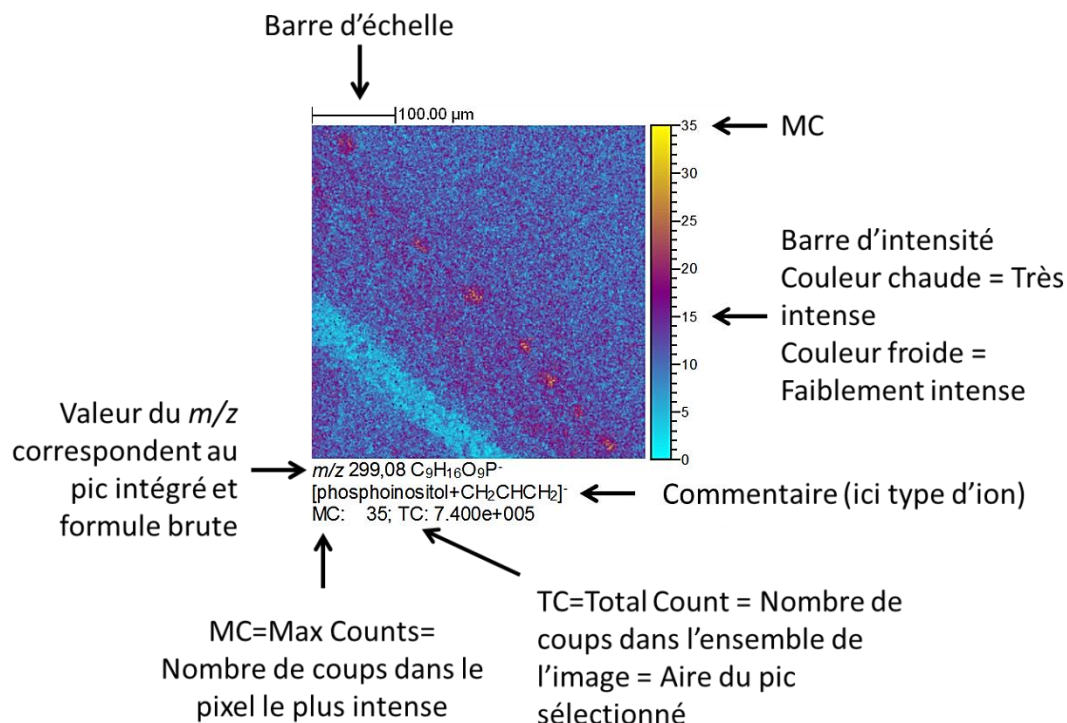


Figure 36 : Exemple d'une image reconstruite avec *Measurement Explorer – Images*.

Opérations sur les images

Les opérations pouvant être appliquées aux images sont les suivantes :

- Modification de la valeur du max count : Cela permet d'augmenter le contraste apparent de l'image.
- Superposition d'images : Cette fonction permet de comparer directement plusieurs images. L'échelle de couleur de chaque image est un gradient permettant de garder l'information sur l'intensité. De plus les superpositions mélangent la couleur des pixels suivant une synthèse additive. Cela permet aussi de garder simultanément la localisation des trois images.
- Line scan : Cette fonction permet de tracer l'intensité d'un ion en fonction de la distance le long d'un segment de droite ou le long d'une bande dont on peut aussi choisir la largeur.
- Addition d'images : Cette fonction permet d'additionner les pixels de différentes images.
- Les régions d'intérêts : La reconstruction de spectre provenant d'une zone d'intérêt dans l'image est une fonction indispensable en imagerie par spectrométrie de masse. Certaines zones de l'image peuvent contenir une signature spectrale différente du spectre de masse total (signal très intense,

co-localisation de certains composés *etc...*). L'obtention du spectre spécifique à cette zone peut révéler la présence de signaux peu intenses dans le spectre de masse total. Ces spectres permettent aussi une quantification relative de certaines espèces ioniques. Le logiciel de traitement de données du TOF-SIMS permet de dessiner des ROI pour *region of interest* ROI. Deux méthodes permettent de dessiner les régions d'intérêt : manuellement en traçant un polygone point par point autour de la zone désirée ou en utilisant des seuils d'intensité pour ne conserver que les zones les plus intenses de l'image. Ensuite, le logiciel reconstruit un spectre de masse correspondant à la ROI. Ce nouveau spectre permet d'intégrer de nouveaux pics absents ou pas assez intenses dans le spectre de masse total afin de reconstruire les cartes de densité ionique, ou de mesurer l'aire de ces signaux. Cet « aller-retour » entre les images et les spectres issus de ROIs est essentiel et constitue un excellent moyen de découvrir des signaux « perdus » dans le bruit de fond du spectre global reconstitué à partir de tous les pixels de l'image.

Measurement Explorer - Profiles

Ce module permet de reconstituer des profils, c'est-à-dire l'aire d'un pic en fonction du temps ou de la dose d'ions primaires. La pente d'un profil permet de mesurer la section efficace d'endommagement pour un couple ion primaire / ion secondaire donné. Ce module n'a pas été beaucoup employé au cours de ma thèse.

II.1.9.b. FlexImaging

FlexImaging 4.1 est le logiciel d'acquisition et de retraitement des images MALDI qui est inclus dans la suite CompassTM. Cette suite comprend aussi FlexAnalysis qui est l'outil de retraitement des spectres de masse MALDI et FlexControl qui est le logiciel de contrôle de l'instrument. FlexImaging ouvre le fichier de mesure ayant comme extension .dat. Les informations sur la séquence sont enregistrées dans un fichier .mis.

FlexImaging 4.1 reconstruit un spectre de masse moyen de l'ensemble des spectres acquis pendant l'acquisition. Sur ce spectre moyen, il est possible de sélectionner des pics d'intérêt, à partir desquels des images ioniques seront générées en tenant compte soit de l'aire soit de l'intensité de ces pics. La liste des pics intégrés est stockée dans un fichier .mir. Le logiciel permet ensuite de tracer des régions d'intérêts, d'exporter des spectres, ou de lire le spectre d'un pixel unique.

En MALDI l'intensité peut varier d'un pixel à un autre, par exemple à cause d'un dépôt non égal, d'effets matrices liés à la présence de sels. Une normalisation des données est alors nécessaire pour réduire ces effets. Il existe différents type de normalisation :

- La normalisation vectorielle : Ce type de normalisation permet d'obtenir une distribution uniforme du signal mais n'est pas adaptée au cas où des signaux intenses ne sont distribués que dans quelques régions limitées en surface.
- La normalisation par le courant ionique total : dans ce cas, la valeur de l'intensité des points de chaque pixel est divisée par la valeur du courant

ionique total. Cette méthode implique que l'aire de tous les spectres soit similaire.

- La normalisation par médiane : cette méthode divise toutes les intensités par rapport à la médiane de l'intensité de tous les points.
- Normalisation par exclusion de masse : cette méthode est semblable à la normalisation par le courant ionique total mais se restreint à une zone du spectre.

FlexImaging 4.1 permet aussi de faire des calculs statistiques notamment des regroupements hiérarchiques. Le principe est de comparer les pixels et de les regrouper en fonction de leurs similarités spectrales. Cependant, FlexImaging 4.1 ne permet pas de faire des analyses en composantes principales, des modèles ou de reconstruire en trois-dimensions une série d'acquisitions de coupes sériées d'un même organe. Des logiciels commerciaux tels que SCILS ou PLS Toolbox offrent plus d'outils statistiques pour retraiter les données MALDI. SCILS permet de faire des regroupements hiérarchiques supervisés et non-supervisés, de l'analyse de données multivariées, de tracer des courbes de corrélation entre deux images ioniques *etc...* PLS Toolbox, permet aussi de faire des regroupements hiérarchiques supervisés et non supervisés, de l'analyse de données multivariées mais permet aussi de créer des modèles. Cependant, ces logiciels n'ont pas été utilisés pour les besoins de cette thèse.

II.1.10. Conclusion sur l'état de l'art

Ce chapitre a décrit les instruments et les méthodes employés pendant cette thèse pour nos projets d'imagerie par spectrométrie de masse appliquée à l'analyse de substances naturelles. Les techniques d'imagerie par spectrométrie de masse ne sont pas nouvelles et ont fait l'objet de nombreuses améliorations, que ce soit au niveau instrumental, sur la préparation d'échantillon, ou encore la collection et le retraitement des données. L'objectif principal de cette thèse a été de déterminer la distribution spatiale à l'échelle cellulaire de métabolites présents dans le bois. Pour cela, l'imagerie TOF-SIMS a été privilégiée car la focalisation du faisceau d'ions primaires est de quelques centaines de nanomètres, ce qui permet d'accéder à une information à l'échelle cellulaire. Cependant il n'existait pas de méthode décrite avec précision dans la littérature pour combiner une bonne résolution en masse et spatiale en TOF-SIMS. Le prochain chapitre traitera de l'étude méthodologique effectuée pour améliorer la résolution en masse avec l'un des meilleurs modes de focalisation des ions. Les études effectuées sur une espèce de bois tropical et sur la communication chimique impliquée entre une souche bactérienne et un champignon constituent les chapitres suivants.

II.1.11. Références

- [1] Thomson, J. J. "Rays of Positive Electricity and their Application to Chemical Analyses" *Longmans, Green and co.*, **1913**. Fac simile édité en **2013** par l'*American Society for Mass Spectrometry*, Sante Fe, NM, USA, www.asms.org
- [2] van der Heide, P. "Secondary Ion Mass Spectrometry: An Introduction to Principles and Practices" Wiley, **2014**.
- [3] Thomson, J. J. "A New Method of Producing Negative Ions" *Physical Review*, **1931**, 38, 1389.
- [4] Woodcock, K. S. "The Emission Of Negative Ions Under The Bombardment Of Positive Ions" 1931, 38, 1696-1703.
- [5] Herzog, R. F. K.; Viehböck, F. P. "Ion Source for Mass Spectrography" *Physical Review*, **1949**, 76, 855-856.
- [6] Castaing, R.; Slodzian, G. "Microanalyse par émission ionique secondaire" *Journal de Microscopie (Paris)*, **1962**, 1, 395-410.
- [7] Galle, P.; Hamburger, J.; Castaing, R. "Sur une nouvelle méthode d'analyse cellulaire utilisant le phénomène d' « émission ionique secondaire »" *Annales de Physique Biologique et Médicale*, **1970**, 42, 83-94
- [8] Liebl, H. J.; Herzog, R. F. K. "Sputtering Ion Source for Solids" *Journal of Applied Physics*, **1963**, 34, 2893-2896.
- [9] Liebl, H. "Ion Microprobe Mass Analyzer" *Journal of Applied Physics*, **1967**, 38, 5277-5283.
- [10] Benninghoven, A. "Analysis of Submonolayers on Silver by Negative Secondary Ion Emission" *Physica Status Solidi*, **1969**, 34, K169-K171.
- [11] Magee, C. W.; Harrington, W. L.; Honig, R. E. "Secondary ion quadrupole mass spectrometer for depth profiling—design and performance evaluation" *Review of Scientific Instruments*, **1978**, 49, 477-785.
- [12] Wittmaack, K.; Staudenmaier, G. "Diatomic versus atomic secondary ion emission" *Applied Physics Letters*, **1975**, 27, 318-320.
- [13] Chait, B. T.; Standing, K. G. "A Time-Of-Flight Mass Spectrometer For Measurement of Secondary Ion Mass Spectra" *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, **1981**, 40, 185-193.
- [14] Bolbach, G.; Viari, A.; Galera, R.; Brunot, A.; Blais, J. C. "Organic film thickness effect in secondary ion mass spectrometry and plasma desorption mass spectrometry" *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, **1992**, 112, 93-100.
- [15] Debois, D. "Imagerie Moléculaire d'échantillons biologiques par spectrométrie de masse ToF-SIMS" *Thèse de doctorat, Université d'Évry Val d'Essonne*, **Octobre 2008**. <http://www.biblio.univ-evry.fr/theses/2008/2008EVRY0014.pdf>.
- [16] Sigmund, P. "Sputtering by Ion Bombardment: Theoretical Concepts" from Behrisch Rainer "Sputtering by particle Bombardment I: Physical Sputtering of Single-Element Solids" *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, **1981**.
- [17] Slodzian, G.; Hennequin, J-F. "Sur l'émission ionique secondaire des métaux en présence d'oxygène" *Comptes Rendus des séances de l'Académie des Sciences, Série B : Science Physique*, **1966**, t. 263, 1246-1249.
- [18] Williams, P. "Sputtered Ion Ejection From Ionic Materials" *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, **1983**, 53, 101-109.
- [19] Plog, C.; Gerhard, W. "Secondary Ion Emission by Nonadiabatic Dissociation of Nascent Ion Molecules with Energies Depending on Solid Composition" *Zeitschrift für Physik B Condensed Matter*, **1983**, 54, 71-86.
- [20] Plog, C.; Gerhard, W. "Secondary Ion Production by Latent Energy of Neutrally Emitted Particles" *Surface Science*, **1985**, 152/153, 127-134.
- [21] Cooks, R. G.; Busch, K. L. "Matrix Effects, Internal Energies and MS/MS Spectra of Molecular Ions Sputtered from Surfaces" *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, **1983**, 53, 111-124.
- [22] Andersen, H. H.; Bay, H. L. "Nonlinear effects in heavy-ion sputtering" *Journal of Applied Physics*, **1974**, 45, 953-954.
- [23] Andersen, H. H.; Bay, H. L. "Heavy-ion sputtering yields of gold: Further evidence of nonlinear effects" *Journal of Applied Physics*, **1975**, 46, 2416-2422.
- [24] Reuter, W. "Secondary Ion Emission from Metal Targets under CF_3^+ and O_2^+ Bombardment" *Analytical Chemistry*, **1987**, 59, 2081-2087.
- [25] Appelhans, A. D.; Delmore, J. E. "Comparison of Polyatomic and Atomic Primary Beams for Secondary Ion Mass Spectrometry of Organics" *Analytical Chemistry*, **1989**, 61, 1087-1093.
- [26] Blain, M. G.; Della-Negra, S.; Joret, H.; Le Beyec, Y.; Schweikert, E. A. "Secondary-Ion Yields from Surfaces Bombarded with keV Molecular and Cluster Ions" *Physical Review Letters*, **1989**, 63, 1625-1628.
- [27] Benguerba, M.; Brunelle, A.; Della-Negra, S.; Depauw, J.; Joret, H.; Le Beyec, Y.; Blain, M. G.; Schweikert, E. A.; Ben Assayag, G.; Sudraud, P. "Impact of slow gold clusters on various solids: nonlinear effects in secondary ion emission" *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, **1991**, 62, 8-22.

-
- [28] Touboul, D.; Kollmer, F.; Niehuis, E.; Brunelle, A.; Lapr v te, O. "Improvement of Biological Time-of-Flight-Secondary Ion Mass Spectrometry Imaging with a Bismuth Cluster Ion Source" *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2005**, *16*, 1608-1618.
- [29] Boussofiane-Baudin, K.; Bolbach, G.; Brunelle, A.; Della-Negra, S.; H kansson, P.; Le Beyec, Y. "Secondary ion emission under cluster impact at low energies (5-60 keV); influence of the number of atoms in the projectile" *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, **1994**, *88*, 160-163.
- [30] Le Beyec, Y. "Cluster impacts at keV and MeV energies: Secondary emission phenomena" *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, **1998**, *174*, 101-117.
- [31] Weibel, D.; Wong, S.; Lockyer, N.; Blenkinsopp, P.; Hill, R.; Vickerman, J. C. "A C₆₀ Primary Ion Beam System for Time of Flight Secondary Ion Mass Spectrometry: Its Development and Secondary Ion Yield Characteristics" *Analytical Chemistry*, **2003**, *75*, 1754-1764.
- [32] Fletcher, J. S.; Conlan, X. A.; Jones, E. A.; Biddulph, G.; Lockyer, N. P.; Vickerman, J. C. "TOF-SIMS Analysis Using C₆₀. Effect of Impact Energy on Yield and Damage" *Analytical Chemistry*, **2006**, *78*, 1827-1831.
- [33] Yamada, I.; Matsuo, J.; Toyoda, N.; Kirkpatrick, A. "Materials processing by gas cluster ion beams" *Materials Science and Engineering, R: Reports*, **2001**, *34*, 231-295.
- [34] Matsuo, J.; Okubo, C.; Seki, T.; Aoki, T.; Toyoda, N.; Yamada, I. "A new secondary ion mass spectrometry (SIMS) system with high-intensity cluster ion source" *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, **2004**, *219-220*, 463-467.
- [35] Postawa, Z.; Rzeznik, L.; Paruch, R.; Russo, M. F.; Winograd, N.; Garrison, B. J. "Depth profiling by cluster projectiles as seen by computer simulations" *Surface and Interface Analysis*, **2011**, *43*, 12-15.
- [36] Shard, A. G.; Havelund, R.; Seah, M. P.; Spencer, S. J.; Gilmore, I. S.; Winograd, N.; Mao, D.; Miyayama, T.; Niehuis, E.; Rading, D.; Moellers, R. "Argon Cluster Ion Beams for Organic Depth Profiling: Results from a VAMAS Interlaboratory Study" *Analytical Chemistry*, **2012**, *84*, 7865-7873.
- [37] Fletcher, J. S.; Lockyer, N. P.; Vaidyanathan, S.; Vickerman, J. C. "TOF-SIMS 3D Biomolecular Imaging of *Xenopus laevis* Oocytes Using Buckminsterfullerene (C₆₀) Primary Ions" *Analytical Chemistry*, **2007**, *79*, 2199-2206.
- [38] Fletcher, J. S.; Rabbani, S.; Henderson, A.; Blenkinsopp, P.; Thompson, S. P.; Lockyer, N. P.; Vickerman, J. C. "A New Dynamic in Mass Spectral Imaging of Single Biological Cell" *Analytical Chemistry*, **2008**, *80*, 9058-9064.
- [39] Jones, E. A.; Lockyer, N. P.; Vickerman, J. C. "Depth Profiling Brain Tissues Sections with a 40 keV C₆₀⁺ Primary Ion Beam" *Analytical Chemistry*, **2009**, *80*, 2125-2132.
- [40] Piwowar, A. M.; Fletcher, J. S.; Kordys, J.; Lockyer, N. P.; Winograd, N.; Vickerman, J. C. "Effects of Cryogenic Sample Analysis on Molecular Depth Profiles with TOF-Secondary Ion Mass Spectrometry" *Analytical Chemistry*, **2010**, *82*, 8291-8299.
- [41] R denauer, F. G. "Multidimensional image acquisition and processing in surface analysis" *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **1989**, *333*, 305-311.
- [42] Hutter, H.; Brunner, Ch.; Nikolov, St.; Mittermayer, Ch.; Grasserbauer, M. "Imaging surface spectroscopy for two- and three-dimensional characterization of materials" *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **1996**, *355*, 585-590.
- [43] Hutter, H.; Nowikow, K.; Gammer, K. "Visualization of 3D-SIMS measurements" *Applied Surface Science*, **2001**, *179*, 161-166.
- [44] Robinson, M. A.; Graham, D. J.; Castner, D. G. "ToF-SIMS Depth Profiling of Cells: z-Correction, 3D Imaging, and Sputter Rate of Individual NIH/3T3 Fibroblasts" *Analytical Chemistry*, **2012**, *84*, 4880-4885.
- [45] Bich, C.; Havelund, R.; Moellers, R.; Touboul, D.; Kollmer, F.; Niehuis, E.; Gilmore, I. S.; Brunelle, A. "Argon Cluster Ion Source Evaluation on Lipid Standards and Rat Brain Tissue Samples" *Analytical Chemistry*, **2013**, *85*, 7745-7752.
- [46] Sheraz n e Rabbani, S.; Barber, A.; Fletcher, J. S.; Lockyer, N. P.; Vickerman, J. C. "Enhancing Secondary Ion Yields in Time of Flight-Secondary Ion Mass Spectrometry Using Water Cluster Primary Beams" *Analytical Chemistry*, **2013**, *85*, 5654-5658.
- [47] Sheraz n e Rabbani, S.; Barber, A.; Berrueta Razo, I.; Fletcher, J. S.; Lockyer, N. P.; Vickerman, J. C. "Prospect of increasing secondary ion yields in ToF-SIMS using water cluster primary ion beams" *Surface and Interface Analysis*, **2014**, *46*, 51-53.
- [48] Sheraz n e Rabbani, S.; Berrueta Razo, I.; Kohn, T.; Lockyer, N. P.; Vickerman, J. C. "Enhancing Ion Yields in Time-of-Flight-Secondary Ion Mass Spectrometry: A Comparative Study of Argon and Water Cluster Primary Beams" *Analytical Chemistry*, **2015**, *87*, 2367-2374.
- [49] Dawson, J. M. "On the Production of Plasma by Giant Pulse Lasers" *Physics of Fluids*, **1964**, *7*, 981-987.
- [50] Tozer, B. A. "Theory of the Ionization of Gases by Laser Beams" *Physical Review*, **1965**, *137*, A 1665-A 1667

- [51] Honig, R. E.; Woolston, J. R. "Laser-Induced Emission of Electrons, Ions, and Neutral Atoms from Solid Surfaces" *Applied Physics Letters*, **1963**, 2, 138-139
- [52] Posthumus, M. A.; Kistemaker, P. G.; Meuzelaar, H. L. C.; Ten Noever de Brauw, M. C. "Laser Desorption-Mass Spectrometry of Polar Nonvolatile Bio-Organic Molecules" *Analytical Chemistry*, **1978**, 50, 987-991.
- [53] Tabet, J.-C.; Cotter, R. J. "Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry of High Mass Molecules" *Analytical Chemistry*, **1984**, 56, 1662-1667.
- [54] Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. "Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry" *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **1988**, 2, 151-153.
- [55] Karas, M.; Hillenkamp, F. "Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons" *Analytical Chemistry*, **1988**, 60, 2299-2301.
- [56] Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F. "Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules" *Analytical Chemistry*, **1985**, 57, 2935-2939.
- [57] Millares, P.; LaCourse, E. J.; Perally, S.; Ward, D. A.; Prescott, M. C.; Hodgkinson, J. E.; Brophy, P. M.; Rees, H. H. "Proteomic Profiling and Protein Identification by MALDI-TOF Spectrometry in Unsequenced Parasitic Nematodes" *Plos One*, **2012**, 7, e33590.
- [58] Frison-Norrie, S.; Sporns, P. "Identification and Quantification of Flavonol Glycosides in Almond Seedcoats Using MALDI-TOF MS" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 2782-2787.
- [59] Kirpekar, F.; Douthwaite, S.; Roepstorff, P. "Mapping posttranscriptional modifications in 5S ribosomal RNA by MALDI mass spectrometry" *RNA*, **2000**, 6, 296-306.
- [60] Peterson, J.; Allikmaa, V.; Subbi, J.; Pehk, T.; Lopp, M. "Structural deviations in poly(amidoamine) dendrimers a MALDI-TOF MS analysis" *European Polymer Journal*, **2003**, 39, 33-42.
- [61] Angel, P. M.; Caprioli, R. M. "Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Imaging Mass Spectrometry: In Situ Molecular Mapping" *Biochemistry*, **2013**, 52, 3818-3828.
- [62] Hillenkamp, F.; Peter-Katalinic, J. "MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods And Applications" *Wiley-VCH*, **2007**.
- [63] Knochenmuss, R. "Photoionization Pathways and Free Electrons in UV-MALDI" *Analytical Chemistry*, **2004**, 76, 3179-3184.
- [64] Knochenmuss, R. "Ion formation mechanisms in UV-MALDI" *The Analyst*, **2006**, 131, 966-986.
- [65] Karas, M.; Glückmann, M.; Schäfer, J. "Ionization on matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors" *Journal of Mass Spectrometry*, **2000**, 35, 1-12.
- [66] Fournier, I.; Brunot, A.; Tabet, J.C.; Bolbach, G. "Delayed extraction experiments using a repulsive potential before ion extraction: Evidence of clusters as ion precursors in UV-MALDI. Part I: Dynamical effects with the matrix 2,5-dihydroxybenzoic acid" *International Journal of Mass Spectrometry*, **2002**, 213, 203-215.
- [67] Soltwisch, J.; Jaskolla, T. W.; Hillenkamp, F.; Karas, M.; Dreisewerd, K. "Ion Yields in UV-MALDI Mass Spectrometry As a Function of Excitation Laser Wavelength and Optical and Physico-Chemical Properties of Classical and Halogen-Substituted MALDI Matrixes" *Analytical Chemistry*, **2012**, 84, 6567-6576.
- [68] Holle, A.; Haase, A.; Kayser, M.; Höndorf, J. "Optimizing UV laser focus profiles for improved MALDI performance" *Journal of Mass Spectrometry*, **2006**, 41, 705-716.
- [69] Stephens, W. E. "A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion" *Physical Review*, **1946**, 69,691.
- [70] Wolff, M. M.; Stephens, W. E. "A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion" *Review of Scientific Instruments*, **1953**, 24, 616-617.
- [71] Cameron, A. E.; Eggers, Jr. D. F. "An Ion "Velocitron"" *The Review of Scientific Instruments*, **1948**, 19, 605-607.
- [72] Cotter, R. J. "Time-of-Flight Mass Spectrometry: Instrumentation and Applications in Biological Research" *ACS Professional Reference Books*, **1997**.
- [73] Wiley, W. C.; McLaren, I. H. "Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution" *The Review of Scientific Instruments*, **1955**, 26, 1150-1157.
- [74] Mamyrin, B. A.; Karataev, V. I.; Shmikk, D. V.; Zagulin, V. A. "The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution" *Soviet Physics – JETP*, **1973**, 37, 45-48.
- [75] Seyer, A. "Imagerie par spectrométrie de masse : Développements Méthodologies et Applications Biologiques" *Thèse de doctorat, Université d'Évry Val d'Essonne*, **Octobre 2010**. <http://www.biblio.univ-evry.fr/theses/2010/2010EVRY0028.pdf>.
- [76] Brunelle, A.; Chaurand, P.; Della-Negra, S.; Le Beyec, Y.; Parilis, E. "Secondary Electron Emission Yields from a CsI Surface Under Impacts of Large Molecules at Low Velocities ($5 \times 10^3 - 7 \times 10^4 \text{ ms}^{-1}$), *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **1997**, 11, 353-62.
- [77] Stresau, R.; Hunter, K.; Sheils, W.; Raffin, P.; Benari, Y. "Particle detection by electron multiplicateur" *United States Patent*, **2004**, Patent number: 6982428.

- [78] Wenzel, R.; Chung, Y.-H.; Nazabal, A. "Enhancement of high mass sensitivity on the Bruker UltraFlex extreme with FlashDetector technology using the CovalX HM2" *60th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, **May 2012**.
- [79] Debois, D.; Bralet, M.-P.; Le Naour, F.; Brunelle, A.; Laprévote, O. "In Situ Lipidomic Analysis of Nonalcoholic Fatty Liver by Cluster TOF-SIMS Imaging" *Analytical Chemistry*, **2009**, *81*, 2823-2831.
- [80] Solé-Domènech, S.; Sjövall, P.; Vukojević, V.; Fernando, R.; Codita, A.; Salve, S.; Bogdanović, N.; Mohammed, A. H.; Hammarström, P.; Nilsson, K. P. R.; LaFerla, F. M.; Jacob, S.; Berggren, P.-O.; Giménez-Llort, L.; Schalling, M.; Terenius, L.; Johansson, B. "Localization of cholesterol, amyloid and glia in Alzheimer's disease transgenic mouse brain tissue using time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) and immunofluorescence imaging" *Acta Neuropathologica*, **2013**, *125*, 145-157.
- [81] Carlred, L.; Gunnarsson, A.; Solé-Domènech, S.; Johansson, B.; Vukojević, V.; Terenius, L.; Codita, A.; Winblad, B.; Schalling, M.; Höök, F.; Sjövall, P. "Simultaneous Imaging of Amyloid- β and Lipids in Brain Tissue Using Antibody-Coupled Liposomes and Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry" *Journal of the American Chemical Society*, **2014**, *136*, 9973-9981.
- [82] Passarelli, M. K.; Newman, C. F.; Marshall, P. S.; West, A.; Gilmore, I. S.; Bunch, J.; Alexander, M. R.; Dollery, C. T. "Single-Cell Analysis: Visualizing Pharmaceutical and Metabolite Uptake in Cells with Label-Free 3D Mass Spectrometry Imaging" *Analytical Chemistry*, **2015**, *87*, 6696-6702.
- [83] Noun, M. "Interaction agrégats-surface. Spectrométrie de masse par temps de vol et application analytique à des études sur des médicaments et sur la météorite Paris" *Thèse de doctorat, Université Paris Sud*, **Novembre 2013**. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00906791>
- [84] Mazel, V.; Richardin, P.; Debois, D.; Touboul, D.; Cotte, M.; Brunelle, A.; Walter, P.; Laprévote, O. "Identification of Ritual Blood in African Artifacts Using TOF-SIMS and Synchrotron Radiation Microspectroscopies" *Analytical Chemistry*, **2007**, *79*, 9253-9260.
- [85] Mazel, V.; Richardin, P.; Touboul, D.; Brunelle, A.; Richard, C.; Laval, E.; Walter, P.; Laprévote, O. "Animal urine as painting materials in African rock art revealed by cluster ToF-SIMS mass spectrometry imaging" *Journal of Mass Spectrometry*, **2010**, *45*, 944-950.
- [86] Richardin, P.; Mazel, V.; Walter, P.; Laprévote, O.; Brunelle, A.; "Identification of Different Copper Green Pigments in Renaissance Paintings by Cluster-TOF-SIMS Imaging Analysis" *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2011**, *22*, 1729-1736.
- [87] Sanyova, J.; Cersoy, S.; Richardin, P.; Laprévote, O.; Walter, P.; Brunelle, A.; "Unexpected Materials in a Rembrandt Painting Characterized by High Spatial Resolution Cluster-TOF-SIMS Imaging" *Analytical Chemistry*, **2011**, *83*, 753-760.
- [88] Tang, X.; Beavis, R.; Ens, W.; Lafortune, F.; Schueler, B.; Standing, K. G. "A Secondary Ion Time-Of-Flight Mass Spectrometer with an Ion Mirror" *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, **1988**, *85*, 43-67.
- [89] Brunelle, A.; Della-Negra, S.; Depauw, J.; Joret, H.; Le Beyec, Y. "Time-of-flight Mass Spectrometry with a Compact Two-stage Electrostatic Mirror: Metastable-ion Studies with High Mass Resolution and Ion Emission from Thick Insulators" *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **1991**, *5*, 40-43.
- [90] Touboul, D.; Brunelle, A.; Laprévote, O. "Structural analysis of secondary ions by post-source decay in time-of-flight secondary ion mass spectrometry" *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2006**, *20*, 703-709.
- [91] Della-Negra, S.; Le Beyec, Y. "New Method for Metastable Ion Studies with a Time of Flight Mass Spectrometer. Future Applications to Molecular Structure Determinations" *Analytical Chemistry*, **1985**, *57*, 2035-2040.
- [92] Fletcher, J. S.; Rabbani, S.; Henderson, A.; Blenkinsopp, P.; Thompson, S. P.; Lockyer, N. P.; Vickerman, J. C. "A New Dynamic in Mass Spectral Imaging of Single Biological Cells" *Analytical Chemistry*, **2008**, *80*, 9058-9064.
- [93] Kollmer, F. "Cluster primary ion bombardment of organic materials" *Applied Surface Science*, **2004**, *231-232*, 153-158.
- [94] Brunelle, A.; Touboul, D.; Laprévote, O. "Biological tissue imaging with time-of-flight secondary ion mass spectrometry and cluster ion source" *Journal of Mass Spectrometry*, **2005**, *40*, 985-999.
- [95] Gilmore, I. S.; Seah, M. P. "Electron flood gun damage in the analysis of polymers and organics in time-of-flight SIMS" *Applied Surface Science*, **2002**, *187*, 89-100.
- [96] Sodhi, R. N. S. "Time-of-Flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS): versatility in chemical imaging surface analysis" *The Analyst*, **2004**, *129*, 483-487.
- [97] Spengler, B.; Hubert, M.; Kaufmann, R. "MALDI ion imaging and biological ion imaging with a new scanning UV-laser microprobe" *Proceedings of the 42nd Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, **1994**, 1041.

-
- [98] Hubert, M.; Spengler, B.; Kaufmann, R. "Development of a new scanning UV-laser microprobe for ion imaging and confocal microscopy" *Proceedings of the 42nd Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, **1994**, 1044.
- [99] Caprioli, R. M.; Farmer, T. B.; Gile, J. "Molecular Imaging of Biological Samples: Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS" *Analytical Chemistry*, **1997**, 69, 4751-4760.
- [100] Stoeckli, M.; Chaurand, P.; Hallahan, D. E.; Caprioli, R. M. "Imaging mass spectrometry: A new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues" *Nature Medicine*, **2001**, 7, 493-496.
- [101] Touboul, D.; Piednoël, H.; Voisin, V.; De La Porte, S.; Brunelle, A.; Halgand, F.; Laprévote, O. "Changes in phospholipid composition within the dystrophic muscle by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and mass spectrometry imaging" *European Journal of Mass Spectrometry*, **2004**, 10, 657-664.
- [102] Franck, J.; Arafah, K.; Elayed, M.; Bonnel, D.; Vergara, D.; Jacquet, A.; Vinatier, D.; Wisztorski, M.; Day, R.; Fournier, I.; Salzert, M. "MALDI Imaging Mass Spectrometry" *Molecular & Cellular Proteomics*, **2009**, 9, 2023-2033.
- [103] Goto-Inoue, N.; Setou, M.; Zaima, N. "Visualization of Spatial Distribution of γ -Aminobutyric Acid Eggplant (*Solanum melongena*) by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Imaging Mass Spectrometry" *Analytical Sciences*, **2010**, 26, 821-825.
- [104] Bhandari, D. R.; Schott, M.; Römpf, A.; Vilcinskas, A.; Spengler, B. "Metabolite localization by atmospheric pressure high-resolution scanning microprobe matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging in whole-body sections and individual organs of the rove beetle *Paederus riparius*" *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2015**, 407, 2189-2201.
- [105] Touboul, D. "Imagerie Biologique par Spectrométrie de Masse, Aspects Fondamentaux, Méthodologies et Applications" *Thèse de doctorat, Université d'Évry Val d'Essonne*, **Septembre 2006**. <http://www.theses.fr/2006EVRY0010>
- [106] Thomas, A.; Laveaux Charbonneau, J.; Fournaise, E.; Chaurand, P. "Sublimation of New Matrix Candidates for High Spatial Resolution Imaging Mass Spectrometry of Lipids: Enhanced Information in Both Positive and Negative Polarities after 1,5-Diaminonaphthalene Deposition" *Analytical Chemistry*, **2012**, 84, 2048-2054.
- [107] Wang, X.; Han, J.; Pan, J.; Borchers, C. H. "Comprehensive Imaging of Porcine Adrenal Gland Lipids by MALDI-FTMS Using Quercetin as a Matrix" *Analytical Chemistry*, **2014**, 86, 638-646.
- [108] Gemperline, E.; Rawson, S.; Li, L. "Optimization and Comparison of Multiple MALDI Matrix Application Methods for Small Molecule Mass Spectrometric Imaging" *Analytical Chemistry*, **2014**, 86, 10030-10035.
- [109] Cerruti, C. D.; Benabdellah, F.; Laprévote, O.; Touboul, D.; Brunelle, A. "MALDI Imaging and Structural Analysis of Rat Brain Lipid Negative Ions with 9-Aminoacridine Matrix" *Analytical Chemistry*, **2012**, 84, 2164-2171.
- [110] Dufresne, M.; Thomas, A.; Breault-Turcot, J.; Masson, J-F.; Chaurand, P. "Silver-Assisted Laser Desorption Ionization For High Spatial Resolution Imaging Mass Spectrometry of Olefins from Thin Tissue Sections" *Analytical Chemistry*, **2013**, 85, 3318-3324.
- [111] Sugiura, Y.; Shimma, S.; Setou, M. "Thin Sectioning Improves the Peak Intensity and Signal-to-Noise Ratio in Direct Tissue Mass Spectrometry" *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*, **2006**, 54, 45-48.
- [112] Setou, M. "Imaging Mass Spectrometry: Protocols for Mass Microscopy" *Springer*, **2010**.

Chapitre III

Méthodologie en imagerie TOF-SIMS

III. Méthodologie en imagerie TOF-SIMS

III.1. Introduction

Le projet initial de cette thèse était de faire des images ioniques de coupes transversales de bois afin de visualiser la distribution spatiale des différentes espèces ioniques à l'échelle cellulaire. Cela a été étudié et est présenté dans le chapitre d'application IV. Dans le cadre de ce sujet, l'utilisation de l'imagerie TOF-SIMS a été privilégiée car comme il a été décrit dans le chapitre précédent, la résolution spatiale pouvant être obtenue avec un TOF-SIMS est actuellement supérieure à celle d'un MALDI-TOF [1]. Nous avons aussi mentionné que le mode *Burst Alignment* permettait d'obtenir avec l'émetteur de bismuth une résolution spatiale de 0,4 μm , ce qui est bien adapté pour l'imagerie de cellule de bois faisant entre 10 et 100 μm de diamètre. Cependant, ce mode implique l'utilisation d'une longue durée d'impulsion d'ions primaires non regroupés en temps. La durée d'émission des ions secondaire étant égale à celle des ions primaires, la résolution en masse obtenue sera unitaire [2,3,4].

Un mode d'extraction des ions secondaires appelé *Burst mode* permet d'obtenir une meilleure résolution en masse en mode *burst alignment* [5]. Le principe du *Burst mode* est de « hacher » la longue impulsion d'ions primaires en une série de n impulsions ayant chacune une durée d'une nanoseconde. Ce mode d'acquisition convient bien à l'analyse d'échantillons contenant peu d'espèces chimiques et aussi pour l'analyse d'ions de faible masse. En revanche, pour des échantillons complexes comme des tissus contenant par exemple beaucoup de lipides le fractionnement du spectre peut le rendre trop complexe voire inexploitable [5].

Il existe d'autres modes de focalisation appelés *Collimated mode* et *Collimated Burst Alignment* permettant d'atteindre des résolutions spatiales proches de 100 nm. Ces modes peuvent atteindre des résolutions en masse de plusieurs milliers si l'extraction fonctionne en *Burst mode*. Cependant, ces modes d'acquisition n'ont pas été exploités dans ce travail à cause de leur principal défaut qui est une très faible intensité du faisceau d'ions primaires. Ils sont par exemple adaptés pour étudier la distribution en surface ou en profondeur des isotopes de l'oxygène. En effet, la faible intensité du faisceau d'ions primaires est dans ce cas un avantage pour éviter une saturation du détecteur due à la très forte intensité de l'isotope $^{16}\text{O}^-$ [6,7,8,9].

D'autres alternatives instrumentales n'impliquant pas un TOF-SIMS de la société ION-TOF existent. Par exemple, l'équipe de Nicholas Winograd a couplé une source de fullerène avec un analyseur qTOF de technologie Q-Star (AB-Sciex). Ce dispositif permet d'obtenir une résolution en masse de 10 000 à 15 000. Mais le couplage qTOF-SIMS a plusieurs inconvénients notamment la mauvaise transmission des ions dans un analyseur quadrupolaire due au cycle utile (*duty cycle*) décrit mathématiquement en (Équation 1).

$$Duty\ cycle = \frac{l}{b} \sqrt{\frac{m/z}{m/z_{max}}} \quad (\text{Équation 1})$$

Dans l'équation 1, m/z_{max} correspond au m/z maximum du spectre, l est la longueur de la fenêtre d'entrée du TOF, et b est le point médian entre la fenêtre d'entrée et le détecteur. Dans la configuration de l'instrument développée dans l'équipe de Winograd, soit 30 mm et 120 mm pour l et b respectivement. Le *duty cycle* est de 8 % à m/z 100 et de 25 % à m/z 1000 pour un m/z_{max} de 1000. Cet effet est partiellement compensé parce que le faisceau de C_{60} est continu [10,11,12].

La société Ionoptika commercialise un instrument appelé le *J105 3D Chemical Imager* où la source d'ions primaires génère aussi un faisceau continu de fullerène. Dans cette configuration, c'est une succession de *bunchers* située après l'extracteur qui permet de regrouper en temps le faisceau d'ions secondaires avant d'entrer dans un réflectron à deux étages [11,12,13,14,15].

Les équipes de Ron Hereen et de Francisco A. Fernandez-Lima ont couplé une source de fullerène avec un analyseur à résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FTICR). Ces alternatives sont intéressantes mais les faisceaux d'ions C_{60} ne peuvent pas être focalisés à moins de 15-20 μm , et si des tailles de faisceau inférieures sont parfois annoncées, cela ne peut être obtenu qu'au prix d'une drastique réduction de l'intensité de ces faisceaux [16,17,18].

Dans le présent chapitre est présenté le travail de méthodologie qui a été fait afin de combiner en imagerie TOF-SIMS une haute résolution spatiale et en masse, soit un diamètre de faisceau inférieur à 1 μm et une résolution en masse de plusieurs milliers à m/z 385,4. Les résultats obtenus sur l'étude de l'effet du courant d'ions primaires en mode HCBU sont présentés. Puis, l'optimisation de la résolution en masse par optimisation de l'extraction retardée en mode BA est détaillée.

III.2. Relation entre le courant d'ion primaire et la résolution spatiale

III.2.1. Brève description de l'anatomie du cervelet de rat

Ce travail méthodologique a été effectué sur des coupes sagittales de cervelet de rat. Ce modèle a été choisi pour les trois raisons suivantes.

- 1) Parce que dans le laboratoire, une connaissance de l'anatomie et de la composition lipidique de cet organe a déjà été développée [3,19,20,21,22,23,24,25,26,27].
- 2) De plus, de nombreuses études sur ce modèle ont déjà été conduites en imagerie par spectrométrie de masse [28,29,30,31,32,33].
- 3) Dans ce tissu existe des petites structures permettant de tester directement les performances en résolution spatiale des différents modes d'acquisition.

Le cervelet de rat est composé de deux zones majoritaires. La première s'appelle la substance blanche, celle-ci est composée de fibres axonales gainées de myéline permettant la conduction du signal nerveux d'une région du cerveau à une autre. La seconde s'appelle substance grise, elle est localisée plus abondamment en périphérie de l'organe dans ce qui est appelé le cortex cérébral. Le cortex cérébral est structuré en trois couches. La première appelée la couche granulaire est composée de cellules granulaires et de cellules de Golgi ainsi que de la projection de certains neurones. À la frontière entre la couche granulaire et le reste du cortex cérébral se trouve une couche de cellules de Purkinje alignées les unes à côté des autres. Au-delà des cellules de Purkinje se trouve la couche moléculaire composée des dendrites des cellules de Purkinje.

III.2.2. La cage de Faraday et les mesures de courant

La cage de Faraday est un élément équipant la plupart des portes échantillons du TOF-SIMS IV. C'est une cavité permettant de mesurer le courant produit par le faisceau d'ions primaires. La charge d'un ion qui pénètre dans cette cavité est collectée pour être finalement mesurée avec un ampèremètre. Les électrons et ions secondaires ne peuvent s'échapper, les premiers étant repoussés par la tension d'extraction des ions secondaires et les seconds ne pouvant s'échapper à cause de la profondeur de la cavité, beaucoup plus grande que son diamètre d'entrée. Ainsi la charge de l'ion incident est effectivement mesurée sans être perturbée par les charges des espèces secondaires produites.

Le courant du faisceau d'ions primaires peut être varié en ajustant la durée d'ouverture de la seconde plaque du système de pulsation/sélection décrit dans la partie II.1.7.a. [4]. Ce sont des basses tensions qui assurent le passage ou non des ions. Cela permet d'ajuster la durée d'impulsion de l'espèce d'ions primaires préalablement sélectionnée. Le logiciel du TOF-SIMS permet de contrôler ce paramètre appelé *width* en ajustant la fréquence des basses tensions. L'ordre de grandeur de la durée d'une impulsion peut être de cinq à plusieurs centaines de nanosecondes.

En mode HCBU, toutes les mesures de courant ont été réalisées en triplicata à une fréquence de 10 kHz. Puisque dans le mode BA le faisceau d'ions primaires est moins intense, et afin d'obtenir un courant plus élevé et donc plus facilement mesurable, la fréquence de mesure a été augmentée à 50 kHz. La Figure 1 montre la mesure du courant pour le Bi_3^+ en fonction de la durée du temps d'ouverture de la seconde plaque du système pulsation/sélection. On remarque qu'entre 5 et 12 ns d'ouverture la relation n'est pas linéaire contrairement aux durées supérieures. Cela peut s'expliquer par les temps d'établissement des tensions du système de pulsation/sélection qui peuvent être du même ordre de grandeur que les temps d'ouverture, conduisant à un temps d'ouverture effectif un peu inférieur à la valeur affichée.

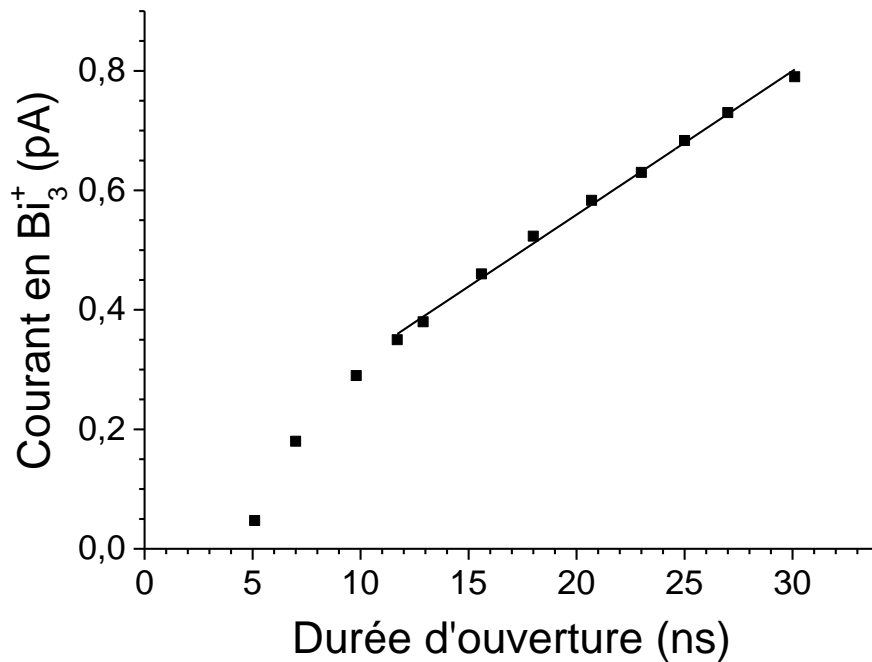


Figure 1 : Mesure du courant du faisceau de Bi_3^+ en fonction du temps d'ouverture de la seconde plaque du système de pulsation/sélection. Les barres d'erreur sont inférieures ou égales à la taille des points. La droite est une régression linéaire pour guider la lecture, et pour laquelle les 3 premiers points expérimentaux n'ont pas été pris en compte.

Il faut aussi préciser que le courant d'ions primaires peut varier notablement entre deux allumages successifs de la source d'ions, ceci parce que le cône de Taylor qui se crée au niveau de la pointe de l'émetteur peut évoluer entre un allumage et un autre. Cela sera toujours précisé par la suite.

III.2.3. Résolutions spatiales

Pour mesurer la résolution spatiale, on mesurera le diamètre du faisceau d'ions primaires, et par la suite ces deux notions seront confondues.

Celui-ci sera mesuré par la méthode appelée *knife-edge* en anglais. Le principe de cette méthode est schématisé en Figure 2. Celle-ci consiste à suivre la convolution d'un signal le long d'une lame de rasoir ou du bord d'une grille [34]. Pour mesurer le diamètre du faisceau d'ions primaires avec un spectromètre de masse TOF-SIMS IV, le faisceau est dévié par des plaques de déflexion basses tensions. Une image est acquise avec un nombre de pixels tel que leur taille est beaucoup plus petite que le diamètre supposé du faisceau d'ions primaires. Ensuite, à l'aide d'un outil appelé *linescan* dans le logiciel de retraitement, l'intensité d'ions secondaires est tracée en fonction de la position sur la grille. Le faisceau d'ions primaires arrivant sur cette grille avec un angle d'incidence de 45° par rapport à la normale, la mesure n'est effectuée que sur un seul des deux axes (fils horizontaux sur la Figure 2a et b). Une mesure faite sur l'autre axe serait faussée par l'épaisseur verticale des fils de la grille.

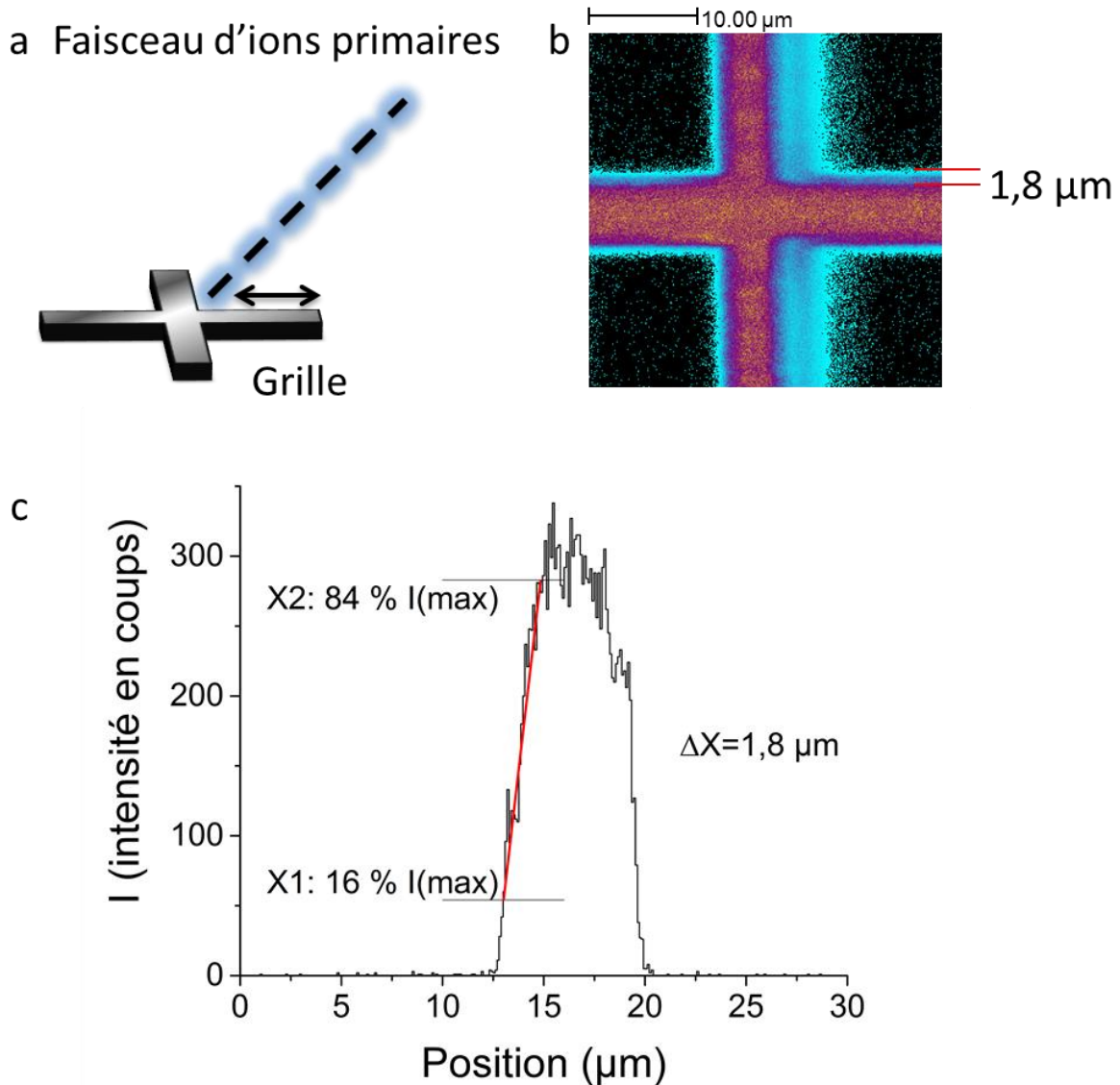
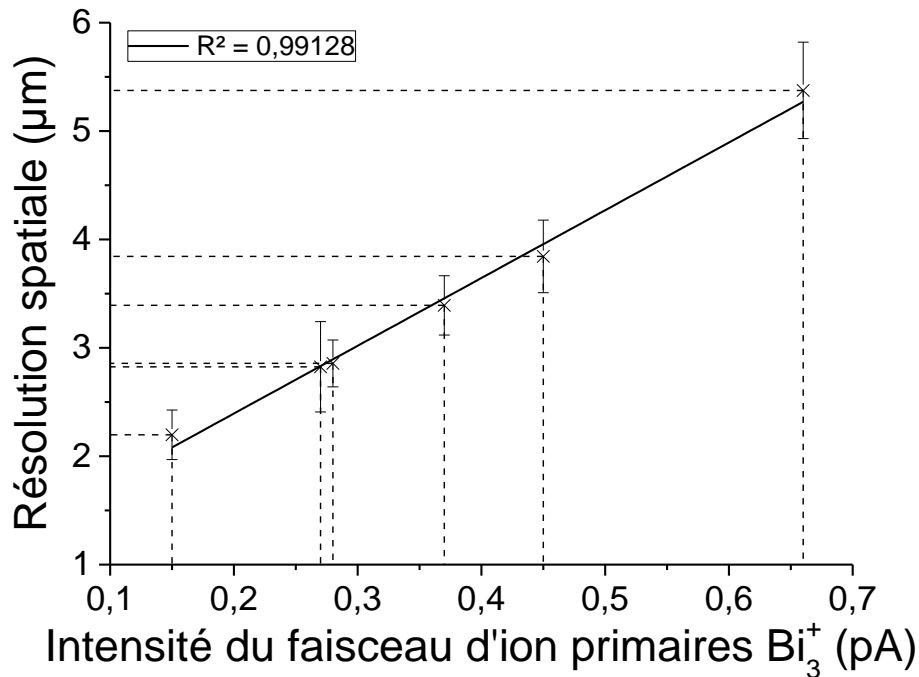


Figure 2 : a) Principe de la mesure du diamètre du faisceau selon la méthode *knife edge* b) Exemple de mesure de diamètre de faisceau c) Intensité en fonction de la position sur la grille. La distance entre $I_{\text{max}}(16 \%)$ et $I_{\text{max}}(84 \%)$ correspond au diamètre du faisceau.

III.2.4. Optimisation du courant pour les différents modes.

La *knife edge method* précédemment décrite a été employée pour mesurer la résolution spatiale à différentes intensités du faisceau d'ion primaire. Pour cela, des images de $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ avec une taille de pixel de $0,4 \mu\text{m}$ ont été enregistrées sur une grille de 1000 fils par pouce en mode HCBU avec une dose de $2 \times 10^{12} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$, l'ion primaire sélectionné est le Bi_3^+ . La relation entre la résolution spatiale et l'intensité du faisceau est illustrée sur le graphique en Figure 3. Une droite de régression linéaire a été calculée entre les différentes mesures : celle-ci montre que la relation entre la résolution spatiale et l'intensité du faisceau est linéaire (la valeur du carré du coefficient de linéarité est de 0,99128). Cette relation est liée au fait que plus le faisceau est intense, plus il sera difficile à focaliser. Dans la littérature, il est convenu d'utiliser ce mode HCBU pour enregistrer des images ayant une taille de pixel de l'ordre de $2 \mu\text{m}$. Il a été prouvé que pour réduire au maximum le recouvrement du faisceau pour une taille de pixel de $2 \mu\text{m}$, il est nécessaire de travailler avec un courant de $0,15 \text{ pA}$ soit à peine deux fois plus qu'en mode BA.


 Figure 3 : Résolution spatiale en fonction de l'intensité en Bi_3^+ .

Des mesures similaires ont été faites pour le mode BA. Dans ce cas, aucune modification notable de la taille du faisceau n'a été mesurée lorsqu'on augmente la durée d'impulsion du faisceau d'ions primaires (Tableau 1).

Durée d'impulsion mode BA (ns)	50,0	100,4	150,0	200,0
Courant d'ion primaire (pA)	0,018	0,048	0,062	0,086
Taille de faisceau (μm)	$0,48 \pm 0,06$	$0,41 \pm 0,03$	$0,39 \pm 0,04$	$0,37 \pm 0,03$

 Tableau 1 : Mesure du courant et du diamètre du faisceau pour différentes durées d'impulsion de Bi_3^+ en mode BA.

Pour montrer l'influence de l'intensité du faisceau de Bi_3^+ sur la qualité des images en mode HCBU, des acquisitions ont été faites sur des coupes sagittales de cervelet de rat à différentes valeurs du courant. Pour cela des images de $500 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$ avec une taille de pixel de $1,9 \mu\text{m}$ ont été acquises avec une fluence de $5 \times 10^{11} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$. La Figure 4 montre la différence entre deux images ioniques totales ayant été acquises avec des intensités du faisceau d'ions primaires de 0,17 pA et de 0,32 pA respectivement. L'image en Figure 4b est bien plus floue que celle obtenue en Figure 4a.

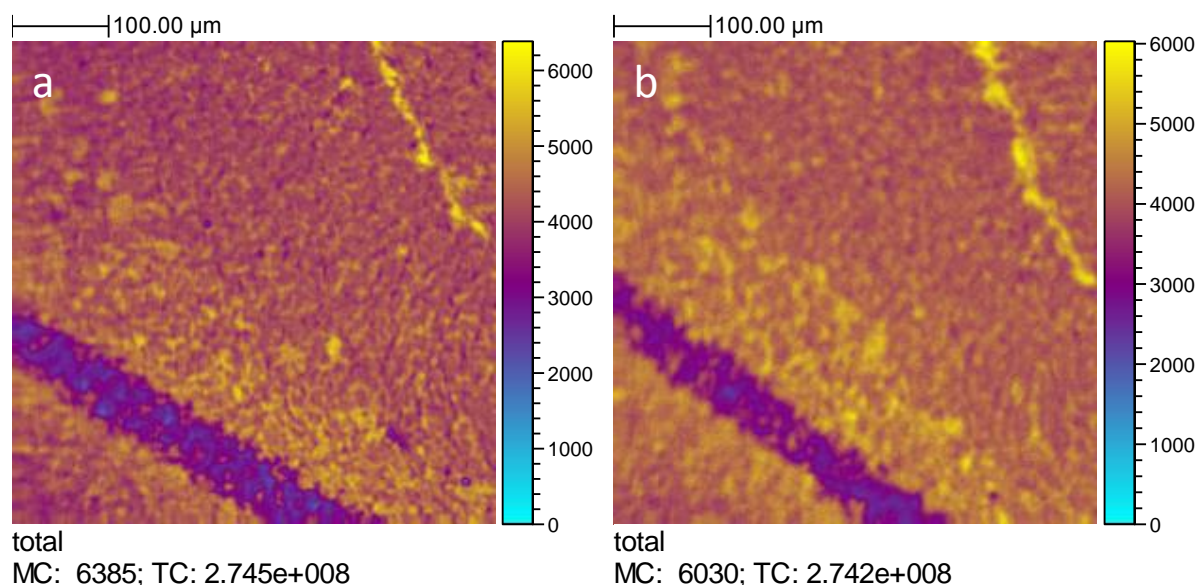


Figure 4 : Comparaison entre deux images enregistrées avec des différentes intensités de Bi_3^+ de a) 0,17 pA et de b) 0,32 pA.

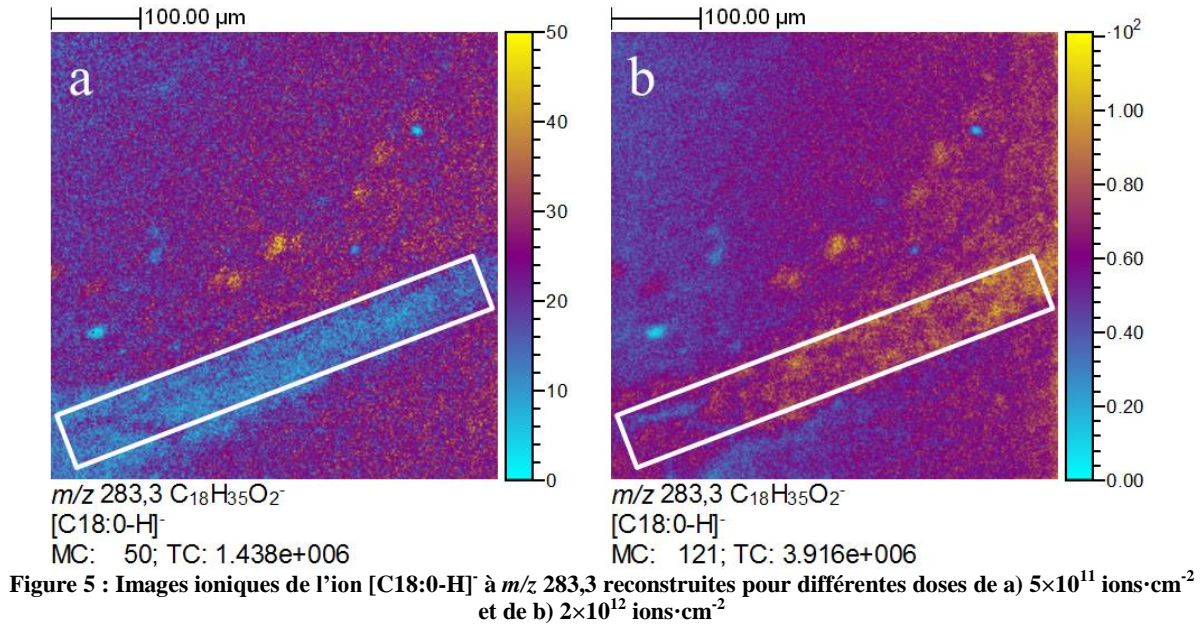
L'analyse des spectres des images de coupes de cervelet de rat obtenues à différentes intensités a été résumée sur le Tableau 2. Les résultats montrent qu'il n'y a pas d'influence sur la résolution en masse en fonction de l'intensité du faisceau. Cela s'explique par le fait que l'impulsion d'ions primaires est regroupée en temps à l'aide d'un dispositif électrostatique appelé *buncher* (décrit en II.1.7.a). La durée de l'impulsion d'ions primaires arrivant sur la surface est déterminée en mesurant la largeur à mi-hauteur du pic de H^+ . Généralement avec un *buncher*, il est possible d'obtenir une impulsion d'ions primaires de 1 ns voire moins. Dans le Tableau 2, la valeur de la largeur à mi-hauteur du pic de H^+ n'est pas significativement différente en fonction de la valeur du courant. L'explication de ces résultats est que le Buncher permet de corriger une distribution axiale d'énergie cinétique des ions primaires mais dégrade la focalisation des ions radialement.

Durée d'émission mode HCBU (ns)	5,1	7	10,2*	12,5	25	25,0 *
Courant d'ion primaire (pA)	0,15	0,27	0,28	0,37	0,45	0,66
Taille de faisceau (μm)	$2,2 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,4$	$2,9 \pm 0,2$	$3,4 \pm 0,3$	$3,8 \pm 0,3$	$5,3 \pm 0,4$
Résolution en masse ($M/\Delta M$) [C ₂₇ H ₄₅] ⁺ à m/z 369,4	4934 ± 152	7383 ± 1930		4494 ± 641	4581 ± 884	5409 ± 692
Résolution en masse ($M/\Delta M$) [C ₂₇ H ₄₅ O] ⁺ à m/z 385,4	4170 ± 361	2865 ± 300		4622 ± 1430	5439 ± 1513	3938 ± 659
largeur du pic H ⁺ (FWHM, ns)	$0,92 \pm 0,17$	$0,91 \pm 0,08$		$0,86 \pm 0,10$	$0,96 \pm 0,08$	$1,32 \pm 0,12$

Tableau 2 : Courant mesuré, taille du faisceau de Bi₃⁺, résolution en masse de l'ion [C₂₇H₄₅]⁺ à m/z 369,4 et de l'ion [C₂₇H₄₅O]⁺ à m/z 385,4 et la largeur à mi-hauteur du pic en fonction de la valeur de la durée d'ouverture de la seconde plaque du système pulsation/sélection (ns) (ΔM est la largeur du pic à mi-hauteur). * À différents allumages de l'émetteur de bismuth.

III.2.5. Effet de matrice

Lors de ces expériences, des migrations de lipides ont été constatées. La Figure 5a montre une image ionique de la molécule déprotonée d'acide stéarique [C₁₈H₃₆O₂-H]⁻ à m/z 283,3 d'une section sagittale de cervelet de rat reconstruite avec une dose d'ions primaires de 5×10^{11} ions·cm⁻². L'ion [M-H]⁻ de l'acide stéarique est particulièrement détecté au niveau des cellules de Purkinje, légèrement présent dans le reste de la substance grise et absent dans la substance blanche entourée sur les images par un rectangle blanc. Cependant, si l'image est reconstruite jusqu'à la dose de 2×10^{12} ions·cm⁻², l'ion à m/z 283,3 est contrairement à l'image précédente particulièrement présent au niveau de la substance blanche.



Une région d'intérêt a été dessinée dans la substance blanche pour tracer le profil de l'intensité des ions $[C_{18}H_{36}O_2-H]^-$ à m/z 283,3 et $[C_{27}H_{46}O-H]^-$ à m/z 385,4 en fonction de la dose d'ions primaires. Ce résultat présenté en Figure 6 montre que l'intensité du cholestérol diminue tout le temps de l'acquisition avec un changement de pente à une fluence proche de 5×10^{11} ions·cm⁻². L'intensité de l'acide stéarique augmente puis reste constante au même point où le changement de pente avait été constaté pour le cholestérol.

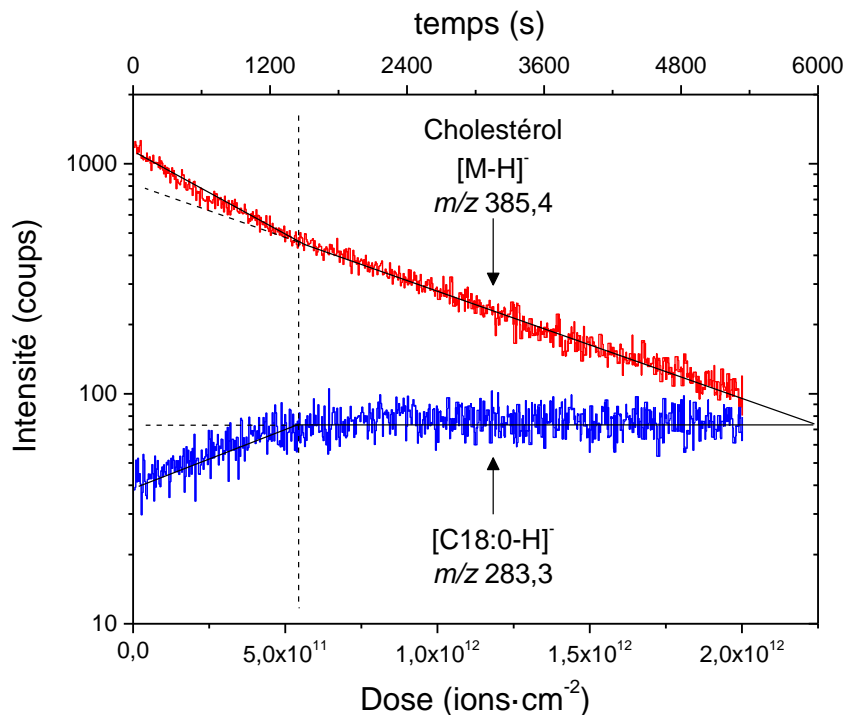


Figure 6 : Intensité en coups des pics des ions $[C18:0-H]^-$ à m/z 283,3 et du cholestérol $[M-H]^-$ à m/z 385,4 en fonction de la dose d'ions primaires en ions·cm⁻² (échelle du bas) et du temps en seconde (échelle du haut). Les profils ont été tracés pour une ROI dans la matière blanche (voir Figure 5). Les lignes pleines et pointillées permettent de guider les yeux.

Des expériences de profilage en profondeur à double faisceaux (*dual beam depth profiling*) effectuées sur des échantillons similaires ont été rapportées dans la littérature [20,25]. Le faisceau utilisé pour le profilage était dans un cas un faisceau de fullerènes [20], et dans le second cas un faisceau d'agrégats d'argon [25]. Dans les deux cas le faisceau d'analyse était un faisceau d'agrégats de bismuth (Bi_3^+). Un effet de matrice induit par le cholestérol a été envisagé, ainsi qu'une migration de certains lipides durant l'étape de déshydratation sous vide. Des expériences à température contrôlée ont aussi été réalisées par Sjövall *et al.* Des images acquises avant et après décongélation ont montré des différences de localisation et d'abondance du cholestérol qui migre à la surface de la substance blanche [35]. Cependant, ici une pulvérisation totale de la couche du cholestérol, supposée s'être concentrée à la surface, n'est pas envisageable puisque que l'expérience a été faite sous des conditions de SIMS statique (dose $< 10^{13}$ ions·cm⁻²). Une éventuelle migration de lipides pendant le temps d'analyse a aussi été envisagé, mais cette hypothèse n'a pas été vérifiée.

III.3. Extraction retardée pour combiner haute résolution en masse et spatiale

L'utilisation de l'extraction retardée en spectrométrie de masse date des années 1955 comme cela a été mentionné dans la partie consacré à la description de cette technique [36]. Cependant cette technique n'a pas eu autant de succès parmi la communauté des utilisateurs de TOF-SIMS que pour celle des utilisateurs de MALDI-TOF [37]. Pourtant cette technique permet de compenser la différence de temps d'émission des ions secondaires notamment lorsque l'on utilise le mode *burst alignment*. Il est possible de lire dans la littérature des auteurs ayant utilisé cette technique pour améliorer la résolution en masse pour des ions produits par la technique SID *Ion/Surface Collisions* qui est une sorte d'alternative à la spectrométrie de masse en tandem où les ions sont fragmentés après leur collision sur une plaque au fond du réflectron [38]. Cette technique est aussi mentionnée pour améliorer la résolution en masse pour du profilage en profondeur de monocouches de Langmuir-Blodgett [39], de biofilm [40], de cellules eucaryotes [41], de peau humaine [42], dans la quantification d'éléments dans du verre [43], et dans le profilage en profondeur de nanostructure [44]. En 2011 et 2012, Lee *et al.* ont publié deux articles traitant des effets topographiques en TOF-SIMS [45,46]. Le premier décrivait comment réduire les effets topographiques d'échantillons conducteurs alors que le second traitait d'échantillons isolants. Dans leur première étude, ils avaient montré que si la tension d'extraction était diminuée, les ombres induites par l'effet topographique diminuaient aussi. Cependant diminuer la tension d'extraction a pour conséquence d'élargir la distribution relative en énergie cinétique des ions secondaires, et donc d'élargir les pics. L'effet de l'extraction retardée sur la topographie a ensuite été étudié. La Figure 7a montre la simulation de la trajectoire des ions secondaires émis depuis un fil d'or d'une épaisseur de 125 µm. En l'absence d'extraction retardée, la trajectoire des ions est plus affectée par la courbure des lignes équipotentielles, les trajectoires représentées en rouge sont celle des ions qui ne pourront pas être collectés par l'analyseur. En Figure 7b est présentée la même simulation mais dans le cas où l'extraction est retardée. Les segments en vert représentent la distance parcourue par les ions avant d'être accélérés, ceux en bleu sont alors les trajectoires des ions une fois accélérés. Contrairement

aux résultats de la Figure 7a, les trajectoires de vol des ions sont moins affectées par la topographie et par conséquent leur transmission est améliorée.

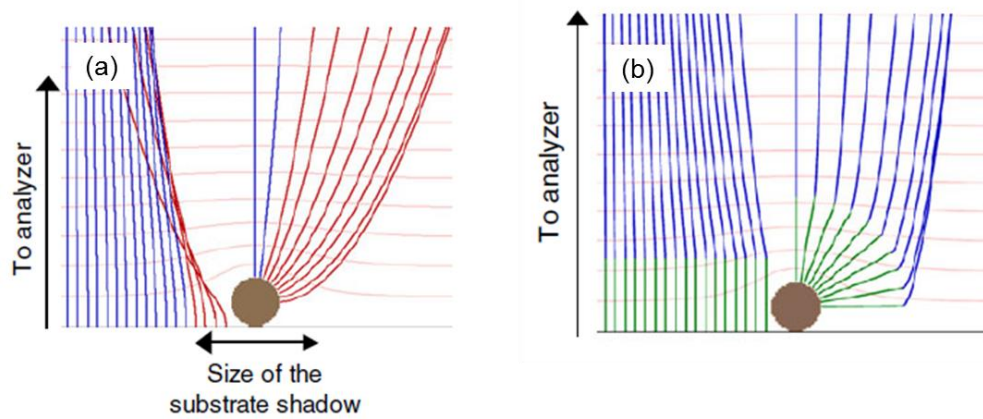


Figure 7 : Simulation de la trajectoire des ions secondaires produit depuis un fil d'or d'une épaisseur de 125 μm et de la surface supportant le fil d'or a) sans extraction retardée b) avec extraction retardée, d'après la référence 45.

Toujours dans ce même article figure la superposition d'une partie de spectres de masse montrant le pic de l'ion Au^+ à différentes valeurs d'extraction retardée. Une amélioration de la résolution en masse pour des valeurs d'extraction retardée de 30 et 50 ns et un élargissement des pics à 70 et 90 ns a été constatée (Figure 8).

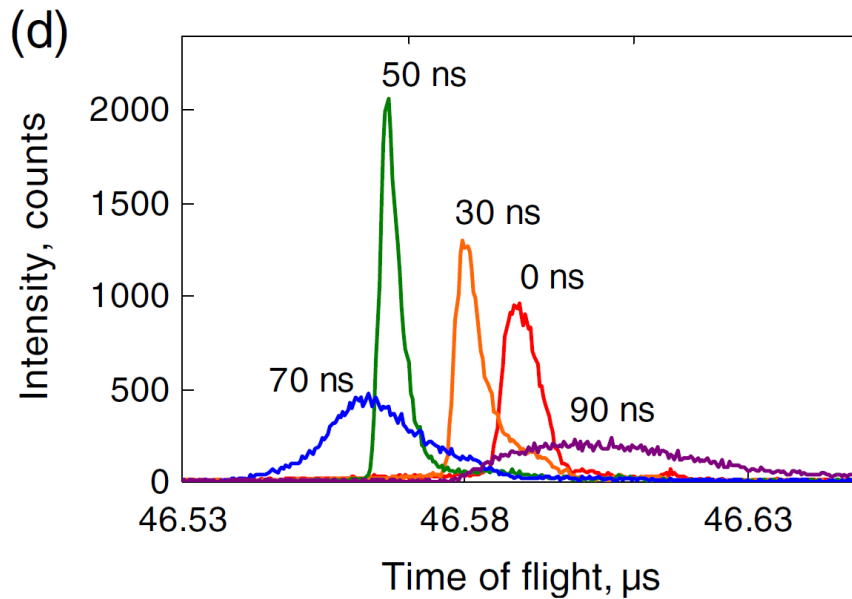


Figure 8 : Temps de vol de l'ion Au^+ pour des valeurs d'extraction retardée de 0 ns (rouge) ; 30 ns (orange) ; 50 ns (vert) ; 70 ns (en bleu) et 90 ns (en violet), d'après la référence 45.

Néanmoins, l'optimisation de la résolution en masse n'a jamais été décrite pour des applications en imagerie biologique. C'est pourquoi une étude méthodologique a été effectuée afin d'employer l'extraction retardée pour avoir une haute résolution en masse et spatiale, tout en gardant un taux de comptage satisfaisant. Les parties suivantes portent sur l'optimisation de l'extraction retardée sur des échantillons biologiques et son application.

III.3.1. Protocole pour l'optimisation de l'extraction retardée

Les coupes de cerveau de rat ont été faites dans le sens sagittal avec un cryostat CM3050-S (Leica Microsystème SAS, Nanterre, France). La température de coupe a été fixée à -20 °C et l'épaisseur des coupes à 16 µm. Celles-ci sont déposées directement après la coupe sur une galette de silicium de 2 pouces de diamètre (ACM, Villiers-Saint-Frédéric, France). Ensuite les coupes sont déshydratées pendant 10 minutes sous une pression de quelques hectopascals.

La résolution en masse a été mesurée sur des spectres enregistrés dans la substance blanche. Cette zone est composée de lipides, dont par exemple, des acides gras, du cholestérol, des sulfatides et aussi de la vitamine E. Des surfaces de 100 µm × 100 µm avec une taille de pixel de 0,78 µm ont été analysées. Une dose de $2,25 \times 10^{11}$ ions·cm⁻² en sélectionnant l'ion Bi₃⁺ a été utilisée pour irradier la surface. La résolution en masse des pics de lipide a été mesurée sur une ROI centrale, à savoir un carré de 50 µm de côté. La valeur de l'extraction retardée est augmentée petit à petit. À chaque modification de ce paramètre, puisque l'environnement électrostatique est modifié, les tensions appliquées sur les plaques de déflexions permettant de déterminer la surface à analyser, et l'alignement des images ioniques et optiques doivent être réajustés. Afin de bien refocaliser le faisceau d'ions secondaires sur le détecteur, la tension de la lentille électrostatique se situant à l'entrée de l'analyseur a été optimisée ainsi que celle appliquée sur la seconde électrode du réflecteur appelée *variable drift path* (VDP). Chaque mesure a été faite sur une zone vierge et en triplicata. La résolution spatiale a été mesurée sur une grille selon la technique *knife edge* décrite précédemment. Pour cela une image 100 µm × 100 µm a été enregistrée avec une taille de pixel de 0,2 µm en mode HCBU et de 0,1 µm en mode BA, avec une fluence de 2×10^{12} ions·cm⁻².

III.3.2. Optimisation de l'extraction retardée en mode BA+DE

Le courant d'ions secondaires total a aussi été contrôlé tout au long de ces mesures. La valeur d'extraction retardée optimale a été déterminée comme étant le meilleur compromis entre la résolution spatiale, en masse, la forme du pic, et la sensibilité (courant ionique secondaire total). La Figure 9 montre qu'en mode de polarité négative, des résolutions en masse de 10 000 et 9 000 sont obtenues pour les pics correspondant respectivement aux molécules déprotonées d'acide palmitique [C₁₆H₃₁O₂]⁻ (*m/z* 255,2) et de cholestérol [C₂₇H₄₅O]⁻ (*m/z* 385,4). En ce qui concerne le mode de polarité positive, une résolution en masse de 10 000 a été atteinte pour à la fois l'ion [M+H-H₂O]⁺ du cholestérol [C₂₇H₄₅]⁺ (*m/z* 369,4) et l'ion radicalaire de la vitamine E [C₂₉H₅₀O₂]⁺⁺ (*m/z* 430,4). Les Figure 9b et e montrent la largeur des pics correspondant respectivement en mode négatif à *m/z* 255,2 et *m/z* 385,4, et en mode positif à *m/z* 369,4 et *m/z* 430,4. Sans extraction retardée, la largeur des pics correspond à la durée d'émission des ions secondaires, qui est elle-même égale à la durée d'impulsion des ions primaires, soit 100 ns. Un des inconvénients de cette technique est une perte de la sensibilité, cela est illustrée en Figure 9 c et f où le nombre de coups total a été tracé en fonction de la valeur de l'extraction retardée : une perte de 50 % et de 30 % est mesurée pour les deux polarités.

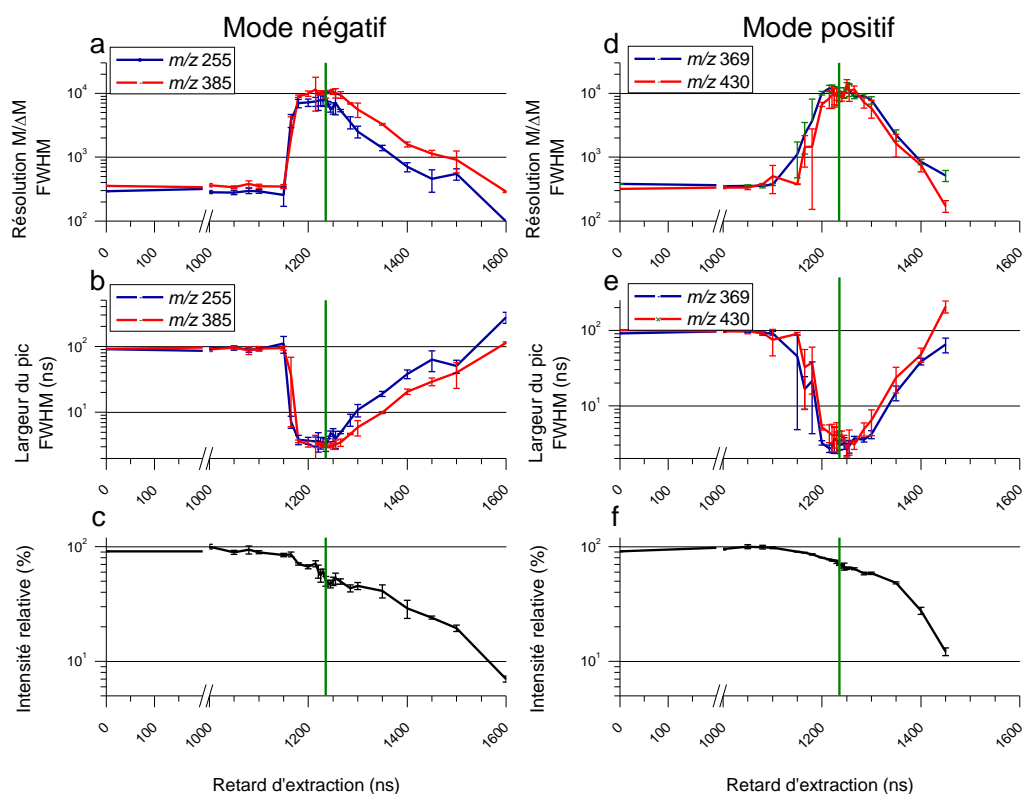


Figure 9 : Optimisation de l'extraction retardée en mode BA. a) résolution en masse des ions $[C_{16}H_{31}O_2]^-$ (m/z 255,2) et $[C_{27}H_{45}O]^-$ (m/z 385,4) en fonction de l'extraction retardée b) largeur des pics à mi-hauteur pour les ions $[C_{16}H_{31}O_2]^-$ (m/z 255,2) et $[C_{27}H_{45}O]^-$ (m/z 385,4) en fonction de l'extraction retardée c) nombre de coups total en fonction de l'extraction retardée en mode négatif d) résolution en masse des ions $[C_{27}H_{45}]^+$ (m/z 369,4) et $[C_{29}H_{50}O_2]^{++}$ (m/z 430,4) en fonction de l'extraction retardée e) largeur des pics à mi-hauteur pour les ions $[C_{27}H_{45}]^+$ (m/z 369,4) et $[C_{29}H_{50}O_2]^{++}$ (m/z 430,4) f) nombre de coups total en fonction de l'extraction retardée en mode positif. Les droites verticales vertes indiquent la valeur optimale de 1235 ns de l'extraction retardée.

Pour déterminer la valeur optimale de l'extraction retardée, la forme du pic a aussi été prise en compte. En effet, pour certaines valeurs intermédiaires, les pics ne sont pas Gaussiens. Cela permet d'expliquer pourquoi sur la Figure 10 les barres d'erreurs sont plus larges sur les mesures allant de 1050 à 1180 ns. La Figure 10 montre la forme des pics de l'ion $[C_{27}H_{45}O]^-$ à m/z 385,4, à 1215 ns de retard d'extraction, le pic est suivi d'une longue traine alors que 10 ns de plus suffisent à s'en affranchir.

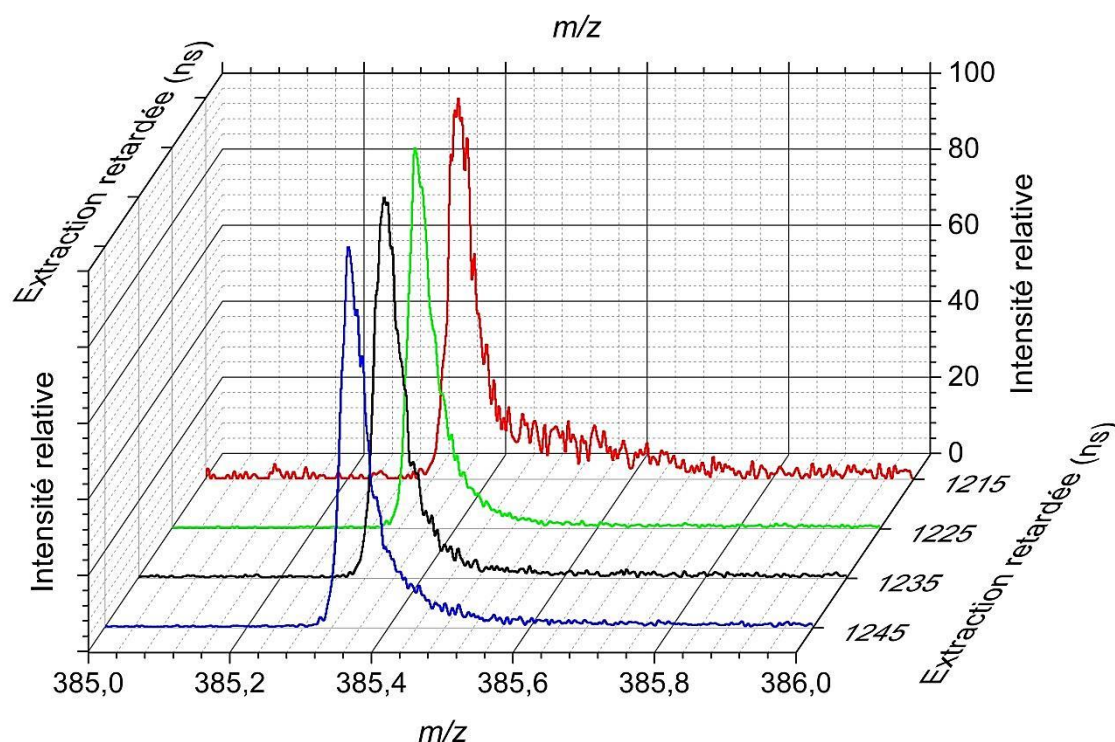


Figure 10 : Superposition de quatre parties de spectres montrant le pic du cholestérol déprotoné à m/z 385,4 obtenus à différentes valeurs d'extraction retardée.

De plus, les mesures de résolution spatiale ont montré que le diamètre du faisceau en mode BA+DE est le même qu'en mode BA, soit environ 400 nm. Ce résultat était attendu puisque que l'ajout d'un retard d'extraction ne change pas la focalisation des ions primaires. Par contre il est à souligner qu'il est nécessaire de modifier les valeurs de plaques de déflexion *X/Y target* et *X/Y stigmator* puisque comme il a été mentionné plus haut, le champ électrostatique rencontré par les ions primaires au niveau de l'échantillon est différent de celui qu'ils rencontrent lorsque l'extraction est continue. Les résultats obtenus pour le mode BA+DE ont été comparés à ceux obtenus aux modes BA et HCBU, et sont résumés dans le Tableau 3.

Mode	HCBU	BA	BA+DE
Résolution en masse ($M/\Delta M$, FWHM) à m/z 385,4	5 340	324	9 270
Diamètre de faisceau (μm)	$2,9 \pm 0,2$	$0,45 \pm 0,06$	$0,46 \pm 0,07$
Retard d'extraction (ns)	0	0	1 235
Courant en Bi_3^+ (pA)	0,28	0,088	0,088

Tableau 3 : Résolution en masse, diamètre de faisceau de Bi_3^+ , valeur du retard d'extraction et courant de Bi_3^+ pour les modes HCBU, BA et BA+DE.

III.3.3. Étude des paramètres de durée d'extraction retardée, énergie et masse des ions secondaires par simulation numérique

Afin de mieux comprendre et caractériser l'extraction retardée, des simulations numériques ont été effectuées à l'Institut de Physique Nucléaire d'Orsay (IPNO) par Michael J. Eller.

La trajectoire et le temps de vol des ions ont été calculés à l'aide du logiciel SIMION 8.1.1.32-2013-05-20. Pour reproduire la durée de l'impulsion des ions primaires, les ions secondaires sont générés pendant 100 ns. Pour simplifier le calcul les ions générés ont tous le même rapport masse-sur-charge de 400. Tout comme dans le spectromètre TOF-SIMS IV l'espace d'accélération a été fixé à 1,5 mm. La tension d'extraction est portée à 2 kV. Les ions peuvent avoir une énergie cinétique initiale comprise entre 0,1 et 1,0 eV, avec une vitesse dont la direction peut varier de $\pm 7^\circ$ par rapport à la normale à la surface, avec une distribution Gaussienne. La Figure 11 montre le temps de vol de ces ions, calculé pour des valeurs d'extraction retardée de 50 ns, 100 ns, 150 ns, et 200 ns. À 50 ns, les premiers ions ayant été émis ont bien été regroupés en temps contrairement aux ions émis après l'extraction. Dans le cas où l'extraction retardée correspond exactement à la durée d'émission des ions, ces derniers ont bien été regroupés en temps et par conséquent une bonne résolution en masse a été obtenue. La distribution d'énergie cinétique initiale fait que les ions évoluent différemment dans l'espace avant d'être soumis au potentiel d'accélération, ce qui se traduit pour les ions les plus rapides par un déficit en énergie.

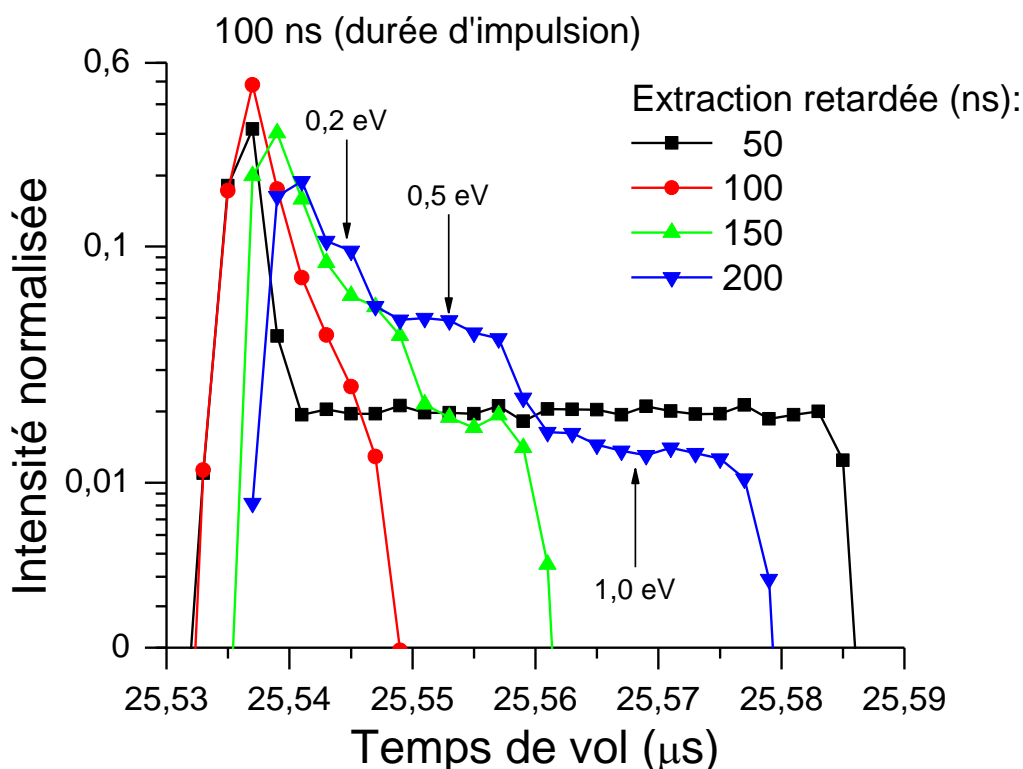


Figure 11 : Calcul des temps de vol d'ions m/z 400 ayant différentes valeurs d'énergie cinétique initiale (0,1 ; 0,2 ; 0,5 ; 1,0 eV). La durée d'émission des ions est de 100 ns. La calcul a été réalisé pour des valeurs d'extraction retardée égales à 50 ns en noir, 100 ns en rouge, 150 ns en vert, et 200 ns en bleu. Les flèches verticales indiquent pour une extraction retardée de 200 ns les groupes d'ions ayant des énergies cinétiques initiales de 0,2 ; 0,5 et 1,0 eV respectivement.

Les simulations ont mis en évidence que la valeur de l'extraction retardée doit être égale au temps de l'impulsion d'ions primaires. Cependant, celle-ci est très différente de la valeur trouvée expérimentalement. L'explication trouvée était que la valeur zéro nanoseconde, ne correspond pas au moment où les ions primaires atteignent la surface, mais au moment où ils sortent de la seconde plaque du système pulsation/sélection. Deux méthodes ont été utilisées afin de déterminer ce décalage. Pour la première, la valeur de l'extraction retardée a été modifiée petit à petit et l'observation d'une modification dans le temps de vol de l'ion H^+ a permis une première estimation. Le résultat est présenté sur la Figure 12a, ce phénomène apparaît entre 1095 et 1100 ns. La seconde méthode a consisté à déterminer l'extraction retardée optimale pour différentes durées d'impulsion d'ions primaires et de tracer une régression linéaire avec ces valeurs pour calculer l'ordonnée à l'origine qui correspond à ce décalage en temps (Figure 12b). Avec cette dernière méthode, le décalage est de 1137 ± 8 ns ce qui est proche du premier résultat obtenu. De plus, si on soustrait 1137 ns correspondant à ce décalage aux 1235 ns correspondant à la valeur optimal d'extraction retardée, la valeur trouvée est de l'ordre de la durée des impulsions d'ions primaires, soit 100 ns. Ces résultats expérimentaux sont en adéquation avec ceux obtenus par simulation. Il était aussi possible de calculer le temps de vol de l'ion Bi_3^+ entre la seconde fenêtre de sélection/pulsation et la surface de l'échantillon pour connaître le décalage. Mais la

distance entre la seconde fenêtre de sélection/pulsation et la surface était inconnue et ne nous a pas été communiqué par le constructeur.

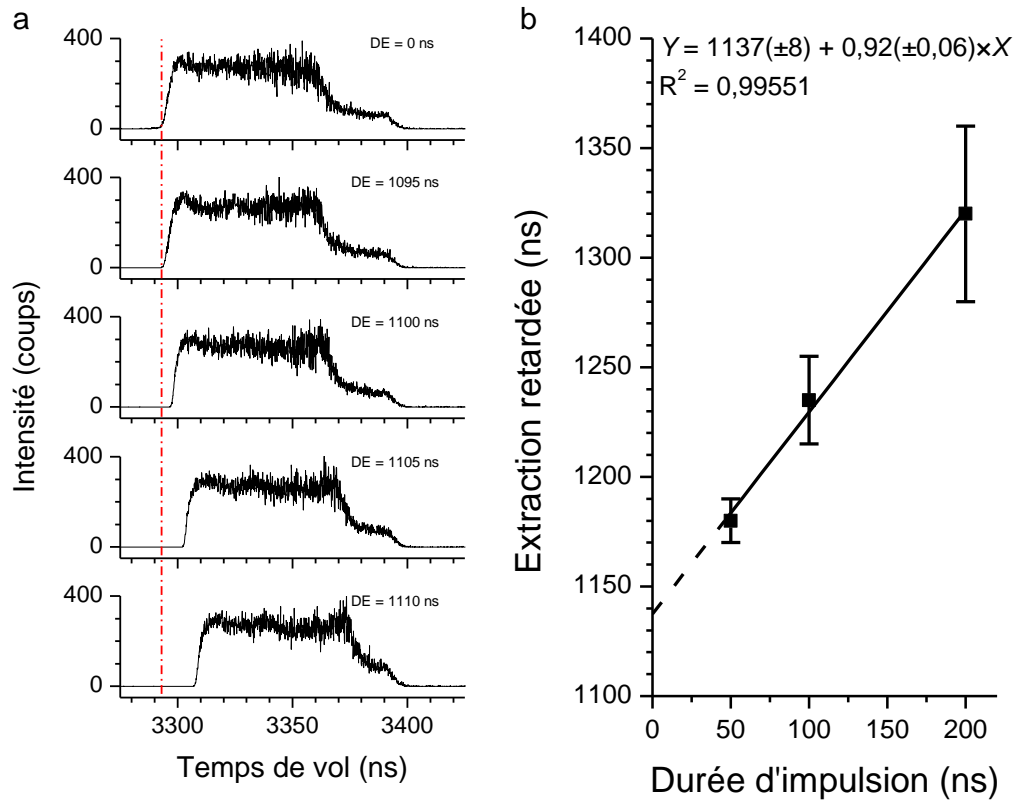


Figure 12 : Détermination du décalage de la valeur d'extraction retardée pour un TOF-SIMS IV a) Portions de spectre de masse montrant le pic de l'ion H⁺ à différentes valeurs d'extraction retardée. La ligne verticale rouge en trait mixte fin permet de mieux voir lorsque le pic est décalé. b) Valeurs d'extraction retardée optimales pour différentes durées d'impulsion des ions primaires. Dans l'équation de la régression linéaire, X représente la durée d'impulsion des ions primaires et Y la valeur de l'extraction retardée. R est le coefficient de linéarité.

D'autres simulations ont été effectuées afin de déterminer l'influence de l'énergie cinétique initiale et de la masse des ions secondaires sur leur trajectoire lorsque l'extraction retardée est utilisée. Pour cela, la trajectoire d'ions à m/z 400 produits pendant 100 ns a été calculée, l'architecture du TOF étant la même que précédemment décrite. L'extraction retardée est fixée à 100 ns et la trajectoire et le temps de vol ont été calculés pour des énergies cinétiques initiales de 0,1 ; 0,2 ; 0,5 et 1,0 eV. La Figure 13 montre qu'à des énergies cinétiques initiales de 0,1 et 0,2 eV les ions sont bien focalisés sur le centre de la surface de la galette de microcanaux. En revanche les ions ayant une énergie cinétique initiale de 0,5 et 1,0 eV sont décentrés et moins focalisés. Ceci s'explique par le plus grand déficit en énergie dû à la moindre accélération de ces ions lorsqu'ils sont soumis à la tension d'accélération.

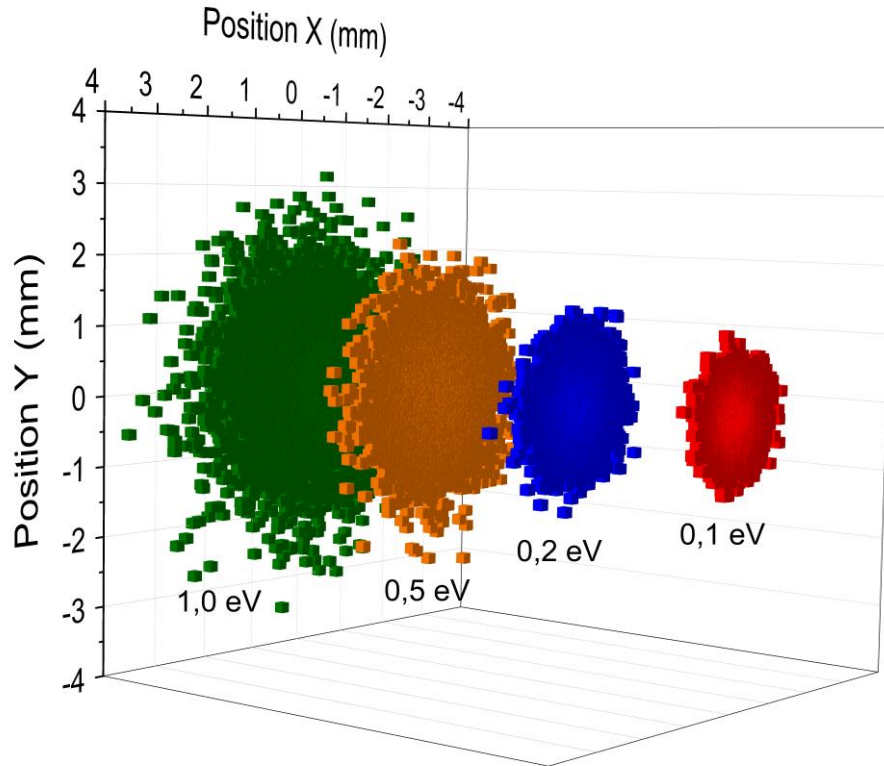


Figure 13 : Simulation SIMION montrant la position des ions secondaires (m/z 400) sur la surface de la galette de microcanaux calculée en fonction de l'énergie cinétique initiale des ions à 0,1 eV (en rouge) ; 0,2 eV (en bleu) ; 0,5 eV (en orange) et à 1,0 eV (en vert).

L'influence du rapport masse-sur-charge a montré des résultats similaires : étant donné que les ions légers ont parcouru une plus grande distance et sont donc moins accélérés, ils auront un déficit en énergie plus important, et celui-ci n'est pas entièrement compensé par le réflecteur. Ces ions légers, comme il est montré sur la Figure 14, sont décentrés par rapport à la galette de microcanaux. Les effets dus à l'énergie cinétique initiale et au rapport masse-sur-charge sont certainement la raison pour laquelle les ions ayant un m/z inférieur à 20 sont faiblement détectés.

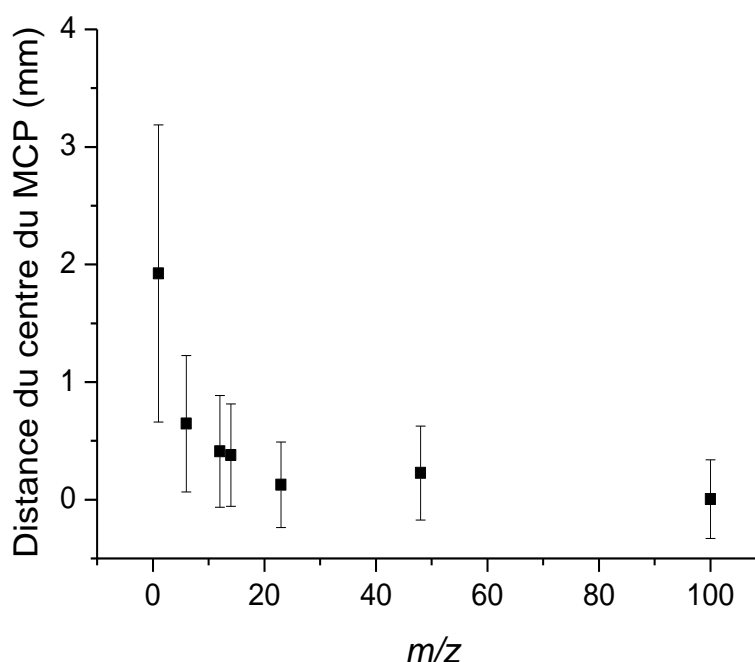


Figure 14 : Position moyenne des ions sur l'axe X de la galette de microcanaux (MCP) en fonction du rapport masse-sur-charge des ions secondaires m/z 1 ; 6 ; 12 ; 14 ; 23 ; 48 et 100.

III.3.4. Application de l'extraction retardée à l'imagerie de lipides sur des sections de cerveau de rat

Les performances du mode BA+DE ont été comparées à celles des modes HCBU et BA. Pour cela, des images ont été acquises sur des coupes adjacentes de cervelet de rat pour analyser des surfaces similaires et n'ayant pas été préalablement irradiées par le faisceau de bismuth. L'intérêt du cervelet et qu'il est structuré en différentes zones histologiques n'ayant pas les mêmes distributions en lipides. Il a été décrit dans la littérature que les cellules de Purkinje ont une composition particulière en lipides, ainsi qu'une taille d'environ 20 μm permettant d'être distinguées en imagerie TOF-SIMS [28,29,47]. En mode BA et BA+DE une surface de 400 $\mu\text{m} \times 400 \mu\text{m}$ a été analysée avec une taille de pixel de 0,4 μm , égale au diamètre du faisceau d'ions primaires. En mode HCBU, le mode de focalisation étant différent une surface légèrement plus grande de 500 $\mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$ a été analysée avec une taille de pixel de 1,9 μm . Dans ce cas, cela permet de faire une image avec un recouvrement modéré des pixels (*oversampling*), la taille du faisceau mesuré en HCBU étant de $2,9 \pm 0,2 \mu\text{m}$. La dose utilisée pour enregistrer les images a été adaptée pour obtenir des images ayant un nombre de coups total similaire pour les trois modes. En mode HCBU une dose de $5 \times 10^{11} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ a été utilisée, en mode BA ce sont $2 \times 10^{12} \text{ ion} \cdot \text{cm}^{-2}$ qui ont été déposés car le rapport signal sur bruit est moindre, et en mode BA+DE deux fois plus d'ions ont été déposés puisque la transmission diminue d'environ 50 % avec l'extraction retardée. La distribution en énergie cinétique des ions secondaires étant faible pour les modes HCBU et BA la relation entre le temps de vol et la racine carrée du rapport masse-sur-charge est toujours linéaire. Pour cette raison, l'étalonnage se fait en interne avec des ions légers. Les ions H^+ , H_2^+ , H_3^+ , C^+ , CH^+ , CH_2^+ , CH_3^+ , C_2H_3^+ et C_2H_5^+ ont été utilisés pour l'étalonnage en

mode positif et les ions C^- , CH^- , CH_2^- , C_2^- , C_3^- et C_4H^- ont été utilisés en mode négatif. En revanche, il a été décrit précédemment que les ions légers sont sujets à un plus grand déficit en énergie cinétique au moment de l'accélération lorsque l'extraction retardée est utilisée. De plus il s'avère dans ce cas que la relation entre le temps de vol et la racine carrée du rapport masse-sur-charge n'est plus linéaire sur toute la gamme de masse analysée. L'étalonnage en masse a alors été effectué en sélectionnant des pics de lipides bien connus. Les ions $C_8H_{19}PNO_4^+$ (fragment de phospholipides, m/z 224,11), $C_{27}H_{45}^+$ (fragment de cholestérol $[M-H_2O+H]^+$, m/z 369,35), $C_{27}H_{45}O^+$ (cholestérol $[M-H]^+$, m/z 385,35) et $C_{29}H_{50}O_2^{++}$ (vitamine E M^{++} , m/z 430,38) ont été utilisés en mode positif, et les ions $C_{16}H_{31}O_2^-$ (palmitate $[C16:0-H]^-$, m/z 255,23), $C_{18}H_{33}O_2^-$ (oléate $[C18:1-H]^-$, m/z 281,25), $C_{18}H_{35}O_2^-$ (stéarate $[C18:0-H]^-$, m/z 283,26), $C_{27}H_{45}O^-$ (cholestérol $[M-H]^-$, m/z 385,35), $C_{29}H_{49}O_2^-$ (vitamine E $[M-H]^-$, m/z 429,37) en mode négatif. Les paramètres des différentes acquisitions sont résumés dans le Tableau 4.

Mode	HCBU	BA	BA+DE
Taille d'image (μm)	500 × 500	400 × 400	400 × 400
Nombre et taille de pixels (μm)	256 × 256 (1.95)	1024 × 1024 (0.39)	1024 × 1024 (0.39)
Dose (ions·cm ⁻²)	5 × 10 ¹¹	2 × 10 ¹²	4 × 10 ¹²
Temps d'acquisition (h)	¼	2	4

Tableau 4 : Paramètres pour les différents modes d'acquisition utilisés pour l'imagerie TOF-SIMS de sections sagittales de cervelet de rat.

La Figure 15a,b et c montre les spectres résultats des trois acquisitions HCBU, BA et BA+DE. La gamme de masse sélectionnée permet de montrer les acides gras déprotonés C16:0, C18:1 et C18:0. Entre les pics des ions $[C18:1-H]^-$ et $[C18:0-H]^-$, pourtant distants de deux unités de masse, le signal ne retourne pas à la ligne de base et les pics intermédiaires, distants d'une unité de masse et correspondant à la distribution isotopique en carbone 13, ne sont pas distingués. La Figure 15d-f correspond à une autre gamme de masse des mêmes spectres, les ions détectés sur cette gamme correspondant à des sulfatides. Le mode HCBU permet de distinguer le degré d'insaturation d'un sulfatide alors que le mode BA ne le permet pas du tout. Cependant, si l'extraction retardée est employée, il est possible de distinguer tous les sulfatides entre eux et de clairement séparer les différentes contributions dues à la distribution isotopique de leurs constituants atomiques. Ce mode d'acquisition permet même d'obtenir un meilleur retour à la ligne de base qu'en mode HCBU, certainement parce que l'extraction permet d'éliminer les effets topographiques comme cela avait été démontré par l'équipe de Ian Gilmore[45]. Pour le mode positif, des résultats similaires sont présentés en Figure 16. Les pics correspondant aux ions $C_{27}H_{45}^+$ (fragment de cholestérol $[M-H_2O+H]^+$, m/z 369,35) et $C_{27}H_{45}O^+$ (cholestérol $[M-H]^+$, m/z 385,35) (a à c) du cholestérol et à l'ion $C_{29}H_{50}O_2^{++}$ (vitamine E M^{++} , m/z 430,38) (d à e) sont mieux séparés en mode BA+DE que pour les deux autres modes.

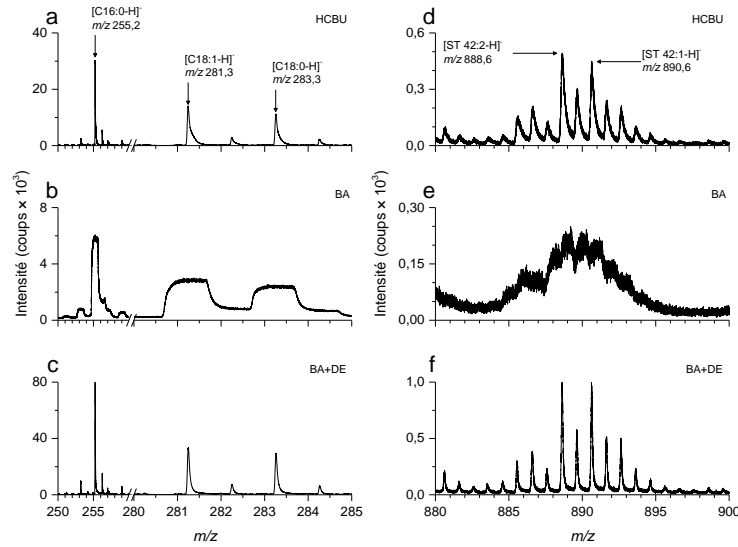


Figure 15 : a, b et c) parties de spectres de masse en mode négatif des images enregistrées sur une section sagittale de cervelet de rat montrant des pics d'acides gras pour les modes HCBU, BA et BA+DE. d, e et f) mêmes spectres montrant des pics de sulfatides pour les modes HCBU, BA et BA+DE.

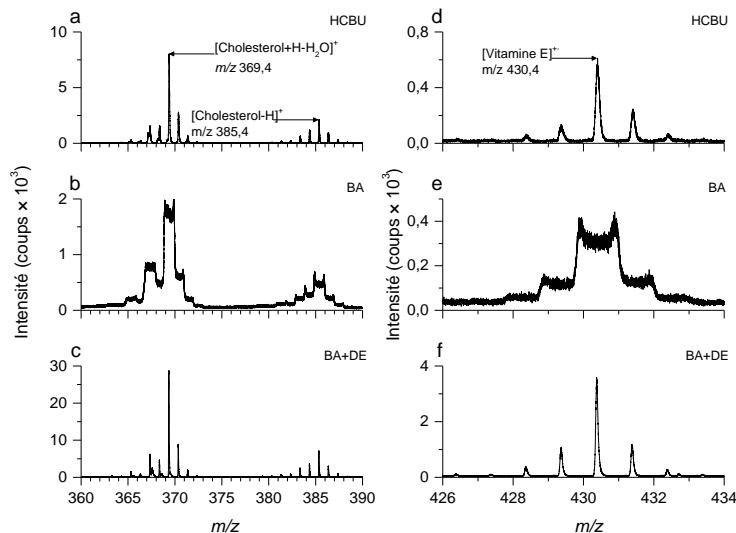


Figure 16 : a, b et c) parties de spectres de masse en mode positif des images enregistrées sur une section sagittale de cervelet de rat montrant des pics du cholestérol pour les modes HCBU, BA et BA+DE. d, e et f) mêmes spectres montrant le massif de la vitamine E pour les modes HCBU, BA et BA+DE.

Pour illustrer les performances du mode BA+DE à distinguer des petites structures dans un échantillon biologique, l'image obtenue en mode BA+DE sur une coupe de cervelet de rat a été comparée à celles obtenues en modes HCBU et BA sur des coupes adjacentes. La Figure 17 montre des superpositions en trois couleurs des images ioniques des ions $C_{18}H_{35}O_2^-$ (stéarate $[C18:0-H]^-$, m/z 283,26) en rouge, $C_{16}H_{31}O_2^-$ (palmitate $[C16:0-H]^-$, m/z 255,23) en vert, et $C_{27}H_{45}O^-$ (cholestérol $[M-H]^-$, m/z 385,35) en bleu, des acquisitions obtenues pour les trois modes. L'image en Figure 17a montre que le mode HCBU permet de distinguer les différentes zones histologiques mais que les cellules de Purkinje sont faiblement résolues. Un zoom sur une cellule de Purkinje unique présenté en Figure 17d montre bien que l'image est fortement « pixélisée ». Les Figure 17b et c montrent que les modes BA et BA+DE

permettent de distinguer les différentes zones histologiques et le zoom sur une cellule de Purkinje en Figure 17e et f montre que ces cellules sont parfaitement définies.

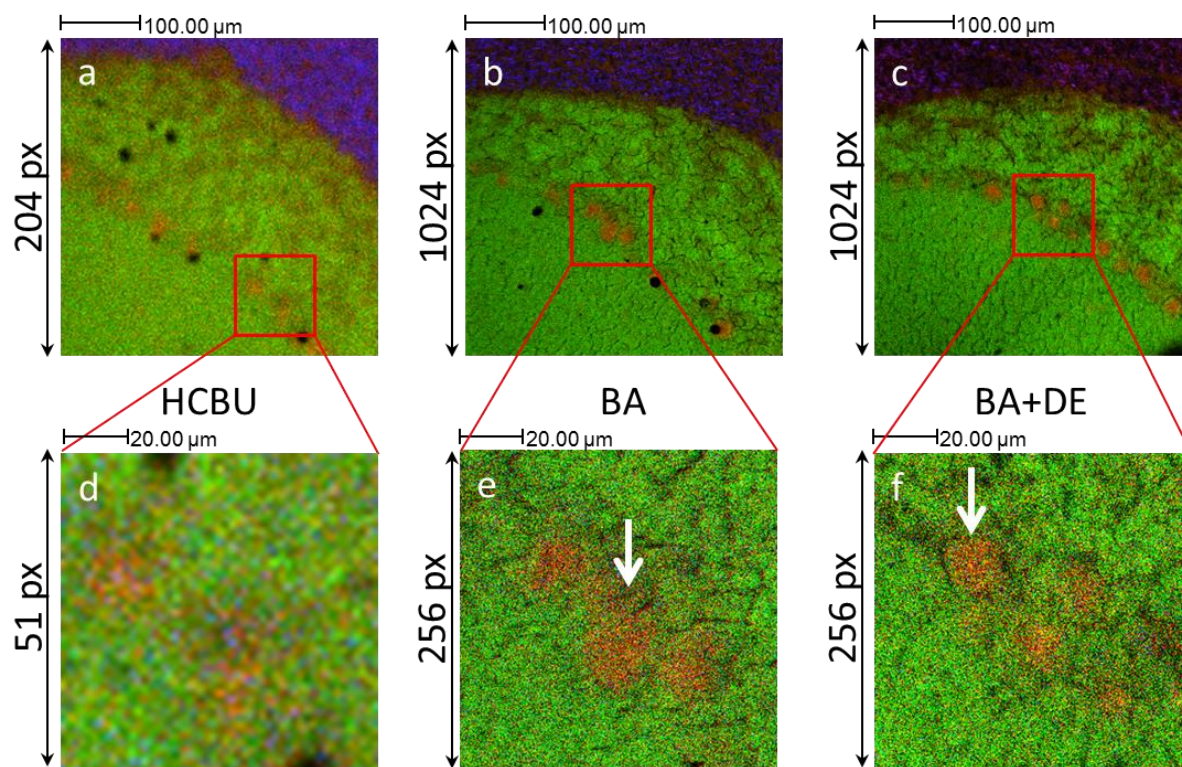


Figure 17 : Superposition trois couleurs d'images ioniques TOF-SIMS enregistrées sur des surfaces de section sagittale de cervelet de rat en mode négatif. Les images ioniques correspondent à $[C18:0-H]^+ m/z 283,3$ (en rouge), $[C16:0-H]^+ m/z 255,2$ (en vert), et cholestérol $[M-H]^+ m/z 385,4$ (en bleu). Les images a à c correspondent aux acquisitions obtenues en mode HCBU, BA et BA+DE respectivement. Les images d à f correspondent à un zoom de $100 \mu m \times 100 \mu m$ des images a à c. Les flèches blanches montrent les cellules de Purkinje. L'image en mode HCBU a été rognée pour être directement comparée aux autres images.

III.4. Conclusion et perspectives

L'imagerie TOF-SIMS est capable d'atteindre des résolutions spatiales de $2 \mu m$ en mode HCBU, à condition que l'intensité du faisceau d'ions primaires n'excède pas $0,2 pA$. La résolution en masse de ce mode est de 5000 à $m/z 385,4$ et l'étalonnage en masse est toujours linéaire sur toute la gamme de masse car les ions secondaires ont une distribution en énergie cinétique initiale qui est faible. Le mode BA, permet d'atteindre une résolution spatiale de $400 nm$ quel que soit le courant du faisceau d'ions primaires. La résolution en masse en mode BA dépend de la durée d'impulsion des ions primaires, mais reste toujours unitaire. Il est possible de « hacher » les impulsions d'ions secondaires pour améliorer la résolution en masse, mais cette alternative complique le spectre obtenu. Une autre possibilité est d'employer une extraction retardée des ions secondaires. Ainsi, une résolution en masse de plus de 9000 a été obtenue à $m/z 385,4$ mais le déficit en énergie cinétique des ions secondaires dépendant alors de leur masse rend l'étalonnage délicat, car la relation de linéarité entre la racine carré du rapport masse-sur-charge et le temps de vol n'est plus exacte. Ce problème est discuté dans le prochain chapitre qui porte sur l'imagerie TOF-SIMS de substances naturelles présentes dans le bois, pour laquelle le mode BA+DE a été caractérisé, et où il est utilisé.

À la valeur d'extraction retardée optimale, une diminution de la transmission par un facteur deux a été mesurée. Cependant, le fait que l'extraction retardée permet de compenser les effets topographiques sur des échantillons ayant de forts reliefs comme le bois, la perte de la transmission est compensée par la diminution de l'effet topographique.

D'autres avancées instrumentales permettant d'obtenir une bonne résolution spatiale et en masse sont à prévoir d'ici peu. En collaboration avec la société pharmaceutique GlaxoSmithKline, ION-TOF GmbH et Thermo Scientific™, l'équipe de Ian Gilmore prévoit de coupler une source SIMS ayant la possibilité d'atteindre une résolution spatiale de 50 nm avec un analyseur Orbitrap™ pouvant atteindre une résolution de plusieurs centaines de milliers. L'application de ce projet est de faire de l'imagerie trois dimensions à l'échelle cellulaire.

Les résultats du travail présenté dans ce chapitre ont été publiés dans le journal *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. Cet article est disponible en annexe 1

III.5. Références

- [1] Römpf, A.; Both, J.-P.; Brunelle, A.; Heeren, R. M. A.; Laprévote, O.; Prideaux, B.; Seyer, A.; Spengler, B.; Stoeckli, M.; Smith, D. F., Mass spectrometry imaging of biological tissue: an approach for multicenter studies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2015**, *407*, 2329-2335.
- [2] Sodhi, R. N. S., Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS):– Versatility in chemical and imaging surface analysis. *The Analyst* **2004**, *129*, 483.
- [3] Touboul, D.; Kollmer, F.; Niehuis, E.; Brunelle, A.; Laprévote, O., Improvement of biological time-of-flight-secondary ion mass spectrometry imaging with a bismuth cluster ion source. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, *16*, 1608-1618.
- [4] Brunelle, A.; Touboul, D.; Laprévote, O., Biological tissue imaging with time-of-flight secondary ion mass spectrometry and cluster ion sources. *Journal of Mass Spectrometry* **2005**, *40*, 985-999.
- [5] Brison, J.; Robinson, M. A.; Benoit, D. S. W.; Muramoto, S.; Stayton, P. S.; Castner, D. G., TOF-SIMS 3D Imaging of Native and Non-Native Species within HeLa Cells. *Analytical Chemistry* **2013**, *85*, 10869-10877.
- [6] Holzlechner, G.; Kubicek, M.; Hutter, H.; Fleig, J., A novel ToF-SIMS operation mode for improved accuracy and lateral resolution of oxygen isotope measurements on oxides. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2013**, *28* (7), 1080.
- [7] Kubicek, M.; Holzlechner, G.; Opitz, A. K.; Larisegger, S.; Hutter, H.; Fleig, J., A novel ToF-SIMS operation mode for sub 100nm lateral resolution: Application and performance. *Applied Surface Science* **2014**, *289*, 407-416.
- [8] Kubicek, M.; Huber, T. M.; Welzl, A.; Penn, A.; Rupp, G. M.; Bernardi, J.; Stöger-Pollach, M.; Hutter, H.; Fleig, J., Electrochemical properties of $\text{La}_{0.6}\text{Sr}_{0.4}\text{CoO}_3-\delta$ thin films investigated by complementary impedance spectroscopy and isotope exchange depth profiling. *Solid State Ionics* **2014**, *256*, 38-44.
- [9] Téllez, H.; Druce, J.; Hong, J.-E.; Ishihara, T.; Kilner, J. A., Accurate and Precise Measurement of Oxygen Isotopic Fractions and Diffusion Profiles by Selective Attenuation of Secondary Ions (SASI). *Analytical Chemistry* **2015**, *87*, 2907-2915.
- [10] Carado, A.; Passarelli, M. K.; Kozole, J.; Wingate, J. E.; Winograd, N.; Loboda, A. V., C_{60} Secondary Ion Mass Spectrometry with a Hybrid-Quadrupole Orthogonal Time-of-Flight Mass Spectrometer. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 7921-7929.
- [11] Passarelli, M. K.; Winograd, N., Lipid imaging with time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2011**, *1811*, 976-990.
- [12] Fletcher, J. S.; Lockyer, N. P.; Vickerman, J. C., Developments in molecular SIMS depth profiling and 3D imaging of biological systems using polyatomic primary ions. *Mass Spectrometry Reviews* **2011**, *30*, 142-174.
- [13] Fletcher, J. S.; Rabbani, S.; Henderson, A.; Blenkinsopp, P.; Thompson, S. P.; Lockyer, N. P.; Vickerman, J. C., A New Dynamic in Mass Spectral Imaging of Single Biological Cells. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 9058-9064.
- [14] Fletcher, J. S.; Vickerman, J. C., A new SIMS paradigm for 2D and 3D molecular imaging of bio-systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, *396* (1), 85-104.
- [15] Fletcher, J. S.; Vickerman, J. C., Secondary Ion Mass Spectrometry: Characterizing Complex Samples in Two and Three Dimensions. *Analytical Chemistry* **2013**, *85*, 610-639.
- [16] Smith, D. F.; Robinson, E. W.; Tolmachev, A. V.; Heeren, R. M. A.; Paša-Tolić, L., C_{60} Secondary Ion Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2011**, *83*, 9552-9556.
- [17] Smith, D. F.; Kiss, A.; Leach, F. E.; Robinson, E. W.; Paša-Tolić, L.; Heeren, R. M. A., High mass accuracy and high mass resolving power FT-ICR secondary ion mass spectrometry for biological tissue imaging. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, *405*, 6069-6076.
- [18] Williams, J. G.; DeBord, J. D.; Smith, D. F.; Anderton, C. R.; Heeren, R. M. A.; Paša-Tolić, L.; Gomer, R. H.; Fernandez-Lima, F. A., Secondary Ion Mass Spectrometry Imaging of *Dictyostelium discoideum* Aggregation Streams. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e99319.
- [19] Touboul, D.; Halgand, F.; Brunelle, A.; Kersting, R.; Elke, T.; Hagenhoff, B.; Laprévote, O., Tissue Molecular Ion Imaging by Gold Cluster Ion Bombardment. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 1550-1559.
- [20] Debois, D.; Brunelle, A.; Laprévote, O., Attempts for molecular depth profiling directly on a rat brain tissue section using fullerene and bismuth cluster ion beams. *International Journal of Mass Spectrometry* **2007**, *260*, 115-120.
- [21] Touboul, D.; Brunelle, A.; Laprévote, O., Mass spectrometry imaging: Towards a lipid microscope? *Biochimie* **2011**, *93*, 113-119.
- [22] Touboul, D.; Laprévote, O.; Brunelle, A., Micrometric molecular histology of lipids by mass spectrometry imaging. *Current Opinion in Chemical Biology* **2011**, *15*, 725-732.

- [23] Bich, C.; Vianello, S.; Guérineau, V.; Touboul, D.; De La Porte, S.; Brunelle, A., Compatibility between TOF-SIMS lipid imaging and histological staining on a rat brain section. *Surface and Interface Analysis* **2013**, *45*, 260-263.
- [24] Bich, C.; Touboul, D.; Brunelle, A., Study of experimental variability in TOF-SIMS mass spectrometry imaging of biological samples. *International Journal of Mass Spectrometry* **2013**, *337*, 43-49.
- [25] Bich, C.; Havelund, R.; Moellers, R.; Touboul, D.; Kollmer, F.; Niehuis, E.; Gilmore, I. S.; Brunelle, A., Argon Cluster Ion Source Evaluation on Lipid Standards and Rat Brain Tissue Samples. *Analytical Chemistry* **2013**, *85*, 7745-7752.
- [26] Touboul, D.; Brunelle, A., TOF-SIMS Imaging of Lipids on Rat Brain Sections. *Methods in Molecular Biology*, **2015**, *1203*, 21-27.
- [27] Touboul, D.; Brunelle, A., MALDI Mass Spectrometry Imaging of Lipids and Primary Metabolites on Rat Brain Sections. *Methods in Molecular Biology*, **2015**, *1203*, 41-48.
- [28] Nygren, H.; Börner, K.; Hagenhoff, B.; Malmberg, P.; Månsson, J.-E., Localization of cholesterol, phosphocholine and galactosylceramide in rat cerebellar cortex with imaging TOF-SIMS equipped with a bismuth cluster ion source. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2005**, *1737*, 102-110.
- [29] Börner, K.; Nygren, H.; Hagenhoff, B.; Malmberg, P.; Tallarek, E.; Månsson, J., Distribution of cholesterol and galactosylceramide in rat cerebellar white matter. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2006**, *1761*, 335-344.
- [30] Zavalin, A.; Yang, J.; Hayden, K.; Vestal, M.; Caprioli, R. M., Tissue protein imaging at 1 μ m laser spot diameter for high spatial resolution and high imaging speed using transmission geometry MALDI TOF MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2015**, *407*, 2337-2342.
- [31] Patterson, N. H.; Thomas, A.; Chaurand, P., Monitoring time-dependent degradation of phospholipids in sectioned tissues by MALDI imaging mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2014**, *49*, 622-627.
- [32] Kadar, H.; Le Douaron, G.; Amar, M.; Ferrié, L.; Figadère, B.; Touboul, D.; Brunelle, A.; Raisman-Vozari, R., MALDI Mass Spectrometry Imaging of 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) in Mouse Brain. *Neurotoxicity Research* **2013**, *25*, 135-145.
- [33] Kadar, H.; Pham, H.; Touboul, D.; Brunelle, A.; Baud, O., Impact of Inhaled Nitric Oxide on the Sulfatide Profile of Neonatal Rat Brain Studied by TOF-SIMS Imaging. *International Journal of Molecular Sciences* **2014**, *15*, 5233-5245.
- [34] Senoner, M.; Wirth, T.; Unger, W. E. S., Imaging surface analysis: Lateral resolution and its relation to contrast and noise. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2010**, *25*, 1440.
- [35] Sjövall, P.; Johansson, B.; Lausmaa, J., Localization of lipids in freeze-dried mouse brain sections by imaging TOF-SIMS. *Applied Surface Science* **2006**, *252*, 6966-6974.
- [36] Wiley, W. C.; McLaren, I. H., Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution. *The review of scientific instruments* **1955**, *26*, 1150-1157.
- [37] Juhasz, P.; Vestal, M. L.; Martin, S. A., On the Initial Velocity of Ions Generated by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization and its Effect on the Calibration of Delayed Extraction Time-of-Flight Mass Spectra. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1997**, *8*, 209-217.
- [38] Haney, L. L.; Riederer, D. E., Delayed extraction for improved resolution of ion/surface collision products by time-of-flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **1999**, *397*, 225-233.
- [39] Sostarecz, A. G.; McQuaw, C. M.; Wucher, A.; Winograd, N., Depth Profiling of Langmuir-Blodgett Films with a Buckminsterfullerene Probe. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 6651-6658.
- [40] Cheng, J.; Winograd, N., Depth Profiling of Peptide Films with TOF-SIMS and a C⁶⁰ Probe. *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 3651-3659.
- [41] Parry, S.; Winograd, N., High-Resolution TOF-SIMS Imaging of Eukaryotic Cells Preserved in a Trehalose Matrix. *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 7950-7957.
- [42] Cersoy, S.; Richardin, P.; Walter, P.; Brunelle, A., Cluster TOF-SIMS imaging of human skin remains: analysis of a South-Andean mummy sample. *Journal of Mass Spectrometry* **2012**, *47*, 338-346.
- [43] King, A.; Henkel, T.; Rost, D.; Lyon, I. C., Determination of relative sensitivity factors during secondary ion sputtering of silicate glasses by Au⁺, Au₂⁺ and Au₃⁺ ions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2010**, *24*, 15-20.
- [44] Baryshev, S. V.; Zinovev, A. V.; Tripa, C. E.; Pellin, M. J.; Peng, Q.; Elam, J. W.; Veryovkin, I. V., High-resolution secondary ion mass spectrometry depth profiling of nanolayers. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2012**, *26*, 2224-2230.
- [45] Lee, J. L. S.; Gilmore, I. S.; Seah, M. P.; Fletcher, I. W., Topography and Field Effects in Secondary Ion Mass Spectrometry – Part I: Conducting Samples. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2011**, *22*, 1718-1728.

- [46] Lee, J. L. S.; Gilmore, I. S.; Seah, M. P.; Levick, A. P.; Shard, A. G., Topography and field effects in secondary ion mass spectrometry Part II: insulating samples. *Surface and Interface Analysis* **2012**, *44*, 238-245.
- [47] Nygren, H.; Börner, K.; Malmberg, P.; Hagenhoff, B., Localization of cholesterol in rat cerebellum with imaging TOF-SIMS. *Applied Surface Science* **2006**, *252*, 6975-6981.

Chapitre IV

**Application de l'imagerie par spectrométrie de masse aux
substances naturelles 1^{ère} partie : Étude de la
duraminisation d'une espèce tropicale**

IV. Application de l'imagerie par spectrométrie de masse aux substances naturelles 1^{ère} partie : Étude de la duraminisation d'une espèce tropicale

La duraminisation du bois est le phénomène où la partie vivante du bois se met à mourir pour produire un bois imputrescible. Malgré son importance économique en sylviculture, ce phénomène n'est ni expliqué ni maîtrisé. L'objectif principal de cette thèse a été d'étudier les changements métaboliques s'opérant autour de la zone de transition où le duramen est produit. La première partie de ce chapitre consiste à décrire l'anatomie du bois et sa composition chimique. Le bois étant un matériau complexe, sa description est nécessaire pour prendre connaissance du vocabulaire associé à la xylologie.

IV.1.1.a. La structure et composition du bois

IV.1.1.Brève description de la cellule végétale

La biologie végétale est une science basée sur l'étude de tous les organismes photosynthétiques, s'intéressant aux microorganismes (bactéries photosynthétiques, micro-algues) jusqu'aux organismes pluricellulaires (macro-algues, plantes, arbres, *etc...*). En ce qui concerne la biologie des végétaux, les cellules végétales ont la particularité de posséder des plastides et une paroi cellulaire située au-delà du plasmalemm (membrane plasmique). Ces parois permettent de rigidifier la cellule. Elles sont constituées de polysaccharides, de glycoprotéines, et de composés phénoliques. Il existe cependant des différences dues aux spécialisations des cellules et aussi entre les différentes espèces [1,2].

La paroi de la cellule végétale est composée de plusieurs éléments :

- La lamelle mitoyenne est une paroi qui apparaît dès la division des noyaux. Elle est dépourvue de cellulose mais chargée d'une substance pectique (composée de pectine) et aussi de lignine (synthétisée au niveau du cambium). Cette « barrière » correspond à la jonction entre les cellules.
- La paroi primaire est formée à la fin de la division cellulaire : elle est constituée de cellulose arrangée en microfibrilles qui sont élaborées par des cellules méristématiques. Une lignification se produit à la fin du développement de la paroi, laquelle reste cependant flexible, laissant la cellule s'étendre pendant la croissance. La paroi primaire est très fine, ~0,1 µm, et peut contenir jusqu'à 90 % d'eau. Son épaisseur se réduit donc en séchant.
- La paroi secondaire est spécifique aux tissus de soutien. On trouve cette paroi entre la paroi primaire et la membrane plasmique. Au-delà de cette membrane, la cellule est généralement vide (morte). Elle est composée de microfibrilles de cellulose, orientées horizontalement en périphérie et verticalement en son centre. On peut y trouver de l'hémicellulose et de la lignine dans le cas des tissus conducteurs ou de soutien. L'hydratation de cette paroi est relativement faible, 20% au maximum. Cette paroi est constituée généralement de trois couches S1, S2 et S3. Une couche gélatineuse

(couche G) peut apparaître si l'arbre doit former du bois de tension dû à une contrainte mécanique. La couche S1 a une épaisseur comprise entre 0,1 et 0,35 μm et l'angle des microfibrilles par rapport à la verticale est de 60 à 80°. La couche S2 est plus épaisse, ~1 à 10 μm , et l'angle des microfibrilles qui influe sur les propriétés mécaniques du bois est plus faible, entre 5 et 30° par rapport à l'axe vertical. La couche S3 est une couche mince de 0,5 à 1,0 μm d'épaisseur et dont les microfibrilles sont orientées de 60 à 90° par rapport à la verticale. La paroi S3 a pour rôle d'empêcher le flambement en cas de compression. La couche G est présente dans le bois de tension qui est produit en réponse à une contrainte mécanique : cette couche est composée de microfibrilles ayant un angle faible par rapport à l'axe vertical [1,2,3].

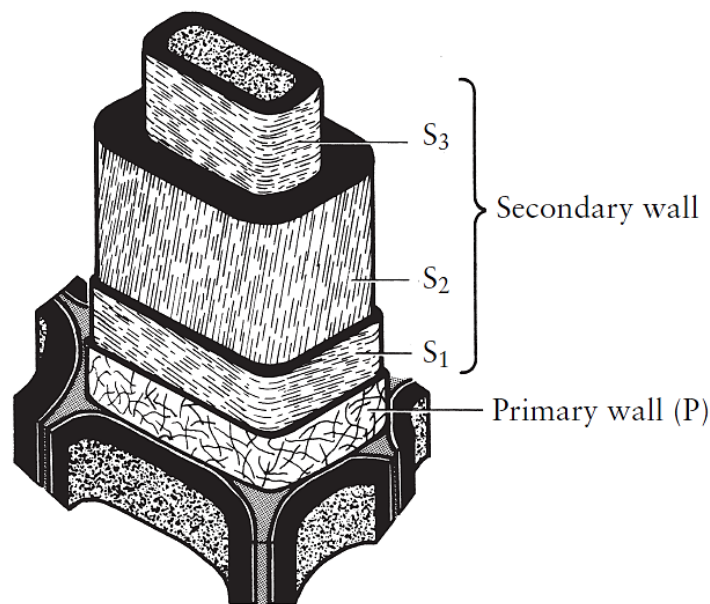


Figure 1 : Schéma des différents constituants d'une paroi végétale.

Une coupe de cellule dans le sens radial permet d'observer des cavités appelées ponctuations qui permettent une communication entre les cellules. Une membrane en suspension permet de colmater ou de laisser échanger des fluides entre les cellules (Figure 2). En fonction de la cellule et de son espèce la forme de la paroi secondaire autour du pore de la ponctuation peut varier selon trois types : simple, alvéolé et semi-alvéolé [1,4]. Dans certaines espèces, un épaississement de la membrane de la ponctuation, appelé un torus, apparaît.

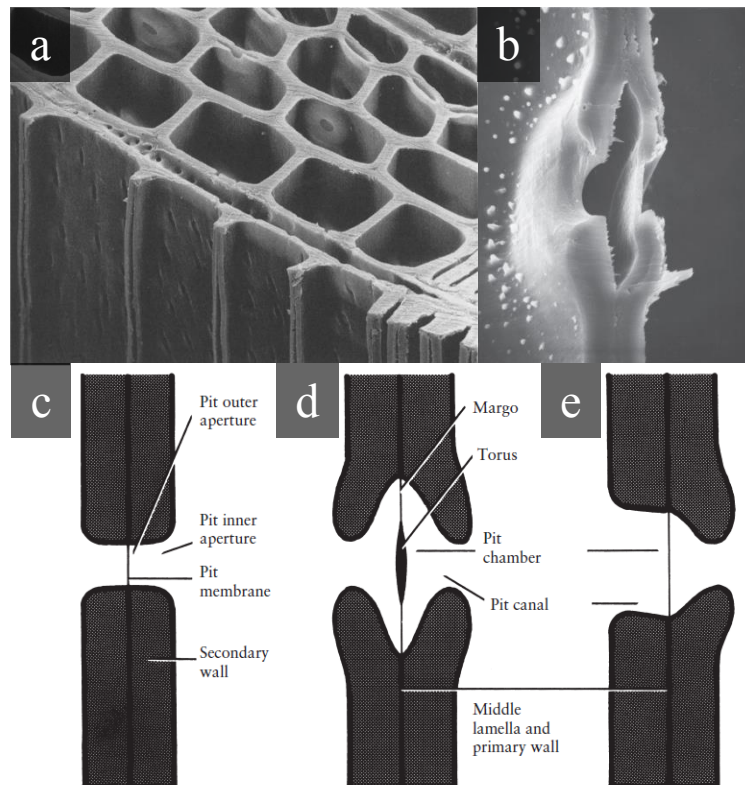


Figure 2 : Images MEB illustrant les ponctuations permettant l'échange intercellulaire a) Ponctuations sur une coupe de bois. b et c) coupe d'une paire de ponctuations. c à d) différents type de ponctuation c) ponctuation simple d) ponctuation alvéolée présentant un torus e) ponctuation semi-alvéolée [4,5].

IV.1.2. Les tissus secondaires du bois

Dans cette partie est décrit et détaillé le rôle des différents tissus secondaires des plantes schématisés en Figure 3. Au début de la croissance des végétaux, la plante est uniquement constituée de tissus primaires (les racines et les bourgeons), qui sont produits par les méristèmes primaires. Rapidement, vont se mettre en place des méristèmes secondaires qui vont être à l'origine des tissus secondaires. Ces derniers, vont cacher voire détruire la structure primaire du végétal. L'étude des tissus primaires ne faisant pas partie de mon projet, ceux-ci ne sont pas décrits.

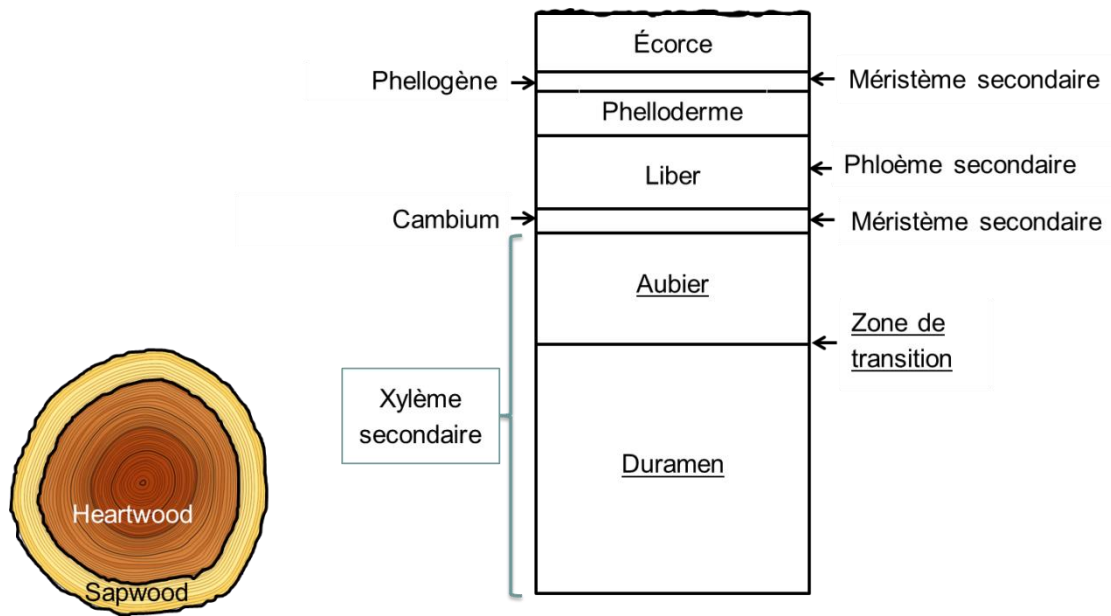


Figure 3 : Représentation schématique des différentes parties anatomiques du bois.

À l'origine, les cellules méristématiques se divisent à la fois sur leurs faces internes et externes. Les cellules filles résultantes se différencient en tissus secondaires :

- Le phellogène (assise subéro-phéllodermique) génère du liège et du phelloderme [1].
- Le cambium (assise libéro-ligneuse), où s'opère la formation du xylème secondaire (bois) et du phloème secondaire (liber) [1].

Le phellogène apparaît dans les couches appelées parenchyme cortical ou collenchyme sous-épidermique [1].

Le cambium paraît au niveau de la structure primaire du végétal (faisceaux criblovasculaires). Les cellules embryonnaires coincées entre le phloème et le xylème primaire vont se différencier pour former le xylème et le liber. La différenciation en xylème est dite centripète car les cellules formées sont repoussées vers l'intérieur du tissu. Le liber est issu d'une différenciation centrifuge car les cellules sont repoussées vers l'extérieur [1]. Les cellules présentes dans le cambium sont constituées de deux types permettant une croissance dans le sens transversal et radial appelées respectivement cellules fusiformes et isodiamétriques. Les cellules fusiformes se différencient en parenchyme axial, trachéide, éléments de vaisseau, fibres, alors que les cellules isodiamétriques se différencient en rayon de parenchyme et rayon de trachéide. La description de ces cellules est présentée en section IV.1.4.

Les tissus secondaires résultant des différenciations cellulaires sont les suivants :

- Le périoderme, qui est issu du phéllogène. Il constitue le liège qui croît sur la partie externe du phéllogène, ce tissu est composé de subérine qui le rend imperméable. À cause de l'imperméabilité de ses cellules, les cellules sous-jacentes meurent rapidement pour former le rhytidome, appelé plus communément l'écorce. Le phelloderme, qui croît vers l'intérieur du rhytidome, est une sorte de parenchyme constitué de cellules minces à parois pecto-cellulosique [1].
- Le cambium formera le liber (phloème secondaire), qui donne des couches concentriques minces de cellules aplaties, telles les feuilles d'un livre, et permet aussi de transporter la sève élaborée. Celle-ci permet de conduire des assimilats exportés par les feuilles. Ce sont majoritairement des glucides à une concentration pouvant atteindre 300 g.L^{-1} et on peut y trouver du saccharose ou des polyols. Le bois (xylème secondaire) est aussi formé à la suite de la différenciation du cambium : on peut distinguer deux tissus dans le bois, appelés aubier et duramen [1].
- L'aubier est constitué de cellules mortes et vivantes. Les fibres ou trachéides présentes dans cette zone assurent le maintien de l'arbre. Il permet de transporter à longue distance (plusieurs mètres) la sève brute, composée principalement d'eau et de sels minéraux absorbés par les racines. La sève permet aussi de transporter des sucres ou autres acides aminés (seuls les végétaux ligneux pérennes utilisent cette stratégie pour nourrir les organes ne pouvant assurer la photosynthèse) [1].
- Le duramen est quant à lui constitué exclusivement de cellules mortes et ne permet pas de conduire la sève brute.
- Le centre du tronc est appelé la moelle et est composé de bois juvénile et de xylème primaire.

Les différences au niveau cellulaire permettent de distinguer deux types de bois : Si le tissu est majoritairement constitué de trachéides (~90 à 95 % du volume), le bois est dit « homoxylé ». Ce sont les Gymnospermes (conifères). Si le bois contient des cellules de parenchyme, des vaisseaux et des fibres, il est dit « hétéroxylé ». Ce sont les Angiospermes (plantes à fleurs) [1,6].

En région tempérée, il est connu que le bois croît différemment selon les saisons. Au printemps, toutes les conditions sont réunies pour que l'arbre pousse convenablement, le bois nouvellement produit est ainsi constitué de grandes cellules fonctionnelles. Ce type de bois est appelé « bois de printemps ». En hiver, la mitose est plus longue, l'arbre produit alors de petites cellules non fonctionnelles. Ce type de bois est appelé « bois d'hiver ». Cette différence dans la croissance du tissu pendant les changements saisonniers explique la formation des anneaux de croissance, appelés cernes [6]. Basée sur le comptage de ces cernes, la dendrochronologie permet de dater les arbres des régions tempérées. En ce qui concerne les bois tropicaux, les anneaux de croissance ne sont pas dus à un changement de saison. Ils existent pourtant et peuvent être expliqués par différents facteurs tels que les périodes sèches, les périodes d'inondations, la photopériode ou encore le phénomène El Niño [4,7].

IV.1.3. Le bois juvénile et bois de réaction

Le bois juvénile est le premier type de bois formé par les arbres, représentant les anneaux de croissance les plus proches de la moelle. Il est caractérisé par la production de cellules ayant, dans leurs parois secondaires, un grand angle de microfibrilles. Ce dernier est corrélé à un rétrécissement du diamètre des cellules de fibre et de trachéide.

Le bois de réaction est similaire au bois juvénile, mais il est formé suite à une contrainte mécanique. Son axe est dévié par rapport à la verticale d'au moins un ou deux degrés. Par exemple, les branches horizontales contiennent une quantité considérable de bois de réaction. Ce bois de réaction est différent entre le bois homoxylé et le bois hétéroxylé : dans le bois homoxylé, le bois de réaction est appelé « bois de compression » et est formé en dessous de la partie penchée, alors que dans le bois hétéroxylé, appelé « bois de tension », est formé au-dessus de la partie déviée. Le bois de compression possède des petites cellules difformes dont les microfibrilles présentent un angle élevé entre elles. Celles-ci sont fortement chargées en lignines. Les cellules du bois de tension sont formées d'une paroi secondaire fortement concentrée en cellulose, la couche G précédemment décrite [6].

IV.1.4. Types cellulaires

Les bois homoxylés et hétéroxylés ne sont pas formés par les mêmes types de cellules. Les bois homoxylés sont plus « primitifs » et sont constitués majoritairement de cellules de trachéides et de rayons de parenchyme. Les bois hétéroxylés sont formés de fibres, cellules de parenchyme, rayons de parenchyme et de vaisseaux.

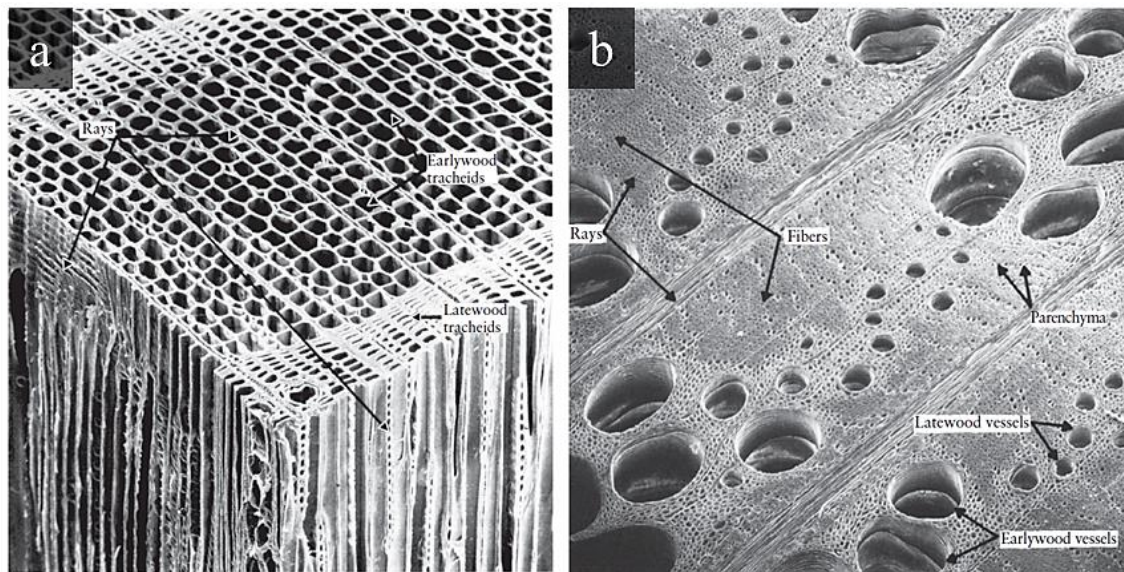


Figure 4 : Images en microscopie électronique à balayage (MEB) de surfaces transversales de bois. a) Bois homoxylé, épinette de Sitka *Picea sitchensis* b) Bois hétéroxylé, chêne rouge *Quercus spp.* [4].

- Les tissus conducteurs : selon le type de bois, les tissus conducteurs sont différents. Dans le bois hétéroxylé, ce sont les vaisseaux (appelé aussi trachées) qui assurent la conduction de la sève brute. La sève élaborée est quant à elle conduite par des tubes criblés au niveau du phloème, ces tubes criblés ne sont donc pas présent dans le bois. Dans le bois homoxylé, ce sont les trachéides (à ne pas confondre avec trachées) qui conduisent la sève brute, ces trachéides peuvent aussi être rencontrées dans des bois

hétéroxylés. Il existe aussi dans les bois homoxylés des canaux résinifères qui comme leur nom l'indique permettent de transporter des résines. [1,4,6].

- Les vaisseaux représentent des rangées de cellules alignées qui fusionnent entre elles au fur et à mesure de leur croissance. Les parois transversales disparaissent, et un capillaire d'un diamètre intérieur de 30 μm est ainsi obtenu. Celui-ci peut atteindre jusqu'à plusieurs mètres de longueur. Les principaux conducteurs d'eau sont les vaisseaux. Une particularité des trachées est qu'elles sont renforcées par un épaissement ponctuel annelé, spiralé ou ponctué (Figure 5). Ce tissu conducteur est dépourvu de noyau (cellules mortes) [1,4,6]. Des excroissances de cellules de parenchyme peuvent apparaître dans le vaisseau lors de la formation du duramen. Le cytoplasme des cellules de parenchyme s'introduit dans les éléments de vaisseaux après qu'une action enzymatique ait détruit les paires de ponctuation qui les séparent. Ce phénomène est appelé la tylose.

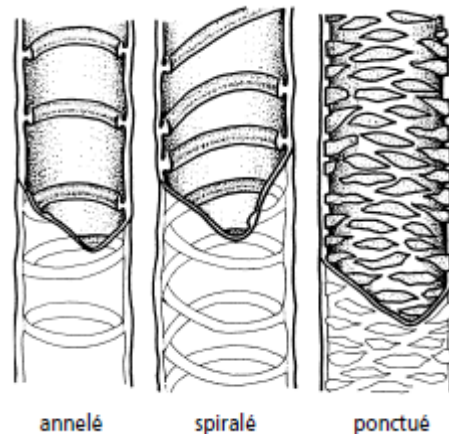


Figure 5 : Schéma des différents types d'épaississement des vaisseaux [1].

- Les trachéides sont des cellules uniques qui peuvent faire 3 à 4 mm de long pour un diamètre variant de 25 à 45 μm . Comme les vaisseaux, ces cellules sont mortes et sans noyaux. Celles-ci composent les bois homoxylés et assurent les fonctions de conduction et de support mécanique.
- Les tubes criblés représentent un agencement de cellules vivantes allongées, ayant des parois transversales perforées et un noyau atrophié. Des cellules compagnes recouvrent le tube criblé afin d'assurer l'échange des assimilats [1].
- Les canaux résinifères sont composés de cellules épithéliales entourées de cellules de parenchyme différenciées de manière à sécréter de la résine. Ces canaux peuvent être verticaux ou horizontaux et permettent de transporter une résine, permettant à l'arbre de guérir les tissus endommagés ou de repousser les attaques d'insectes [1,4].
- Les fibres : ces cellules ressemblent aux trachéides des bois homoxylés mais sont moins longues et toutes mortes, non spécialisées, et ayant uniquement une fonction de support [4].
- Parenchymes axiaux : c'est un type de cellule que l'on retrouve majoritairement dans le bois hétéroxylé. Ces cellules ont une taille et une forme similaires aux cellules de rayon de parenchyme mais sont orientées verticalement. Les rayons de parenchyme et

les parenchymes axiaux sont assemblées les uns sur les autres pour former des nœuds. On peut distinguer deux types de parenchymes axiaux : ceux associés aux vaisseaux, appelés « parenchymes paratrachéaux », et ceux n'étant pas associés aux vaisseaux, appelés « parenchymes apotrachéaux ». Ces deux types peuvent s'organiser différemment (Figure 6). Les parenchymes paratrachéaux peuvent être vasicentriques, c'est-à-dire uniquement autour du vaisseau, ou aliformes, correspondant à un débordement autour du vaisseau en forme d'aile, ou encore confluent. Dans ce cas, les cellules de parenchymes axiaux forment une bande rejoignant les autres vaisseaux. En ce qui concerne les parenchymes apotrachéaux, ils peuvent se distribuer de trois manières différentes : soit de manière aléatoire (*diffuse aggregate*), soit en bande tout le long de l'anneau de croissance, ou enfin, de manière marginale en se présentant uniquement au début et à la fin d'un anneau de croissance [4]. Dans les bois homoxylés, elles sont spécialisées dans la production de résine entourant les canaux de résine [4].

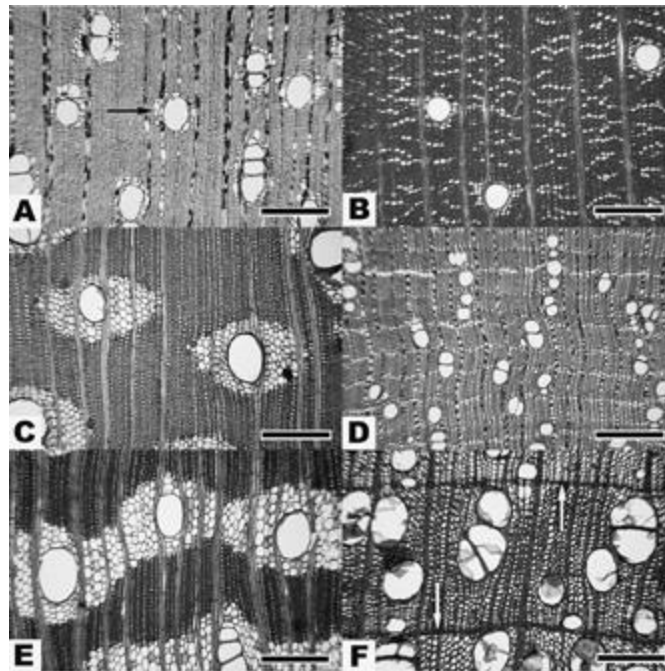


Figure 6 : Les différentes distributions des cellules de parenchymes axiales à travers différentes coupes de bois. A) distribution vasicentrique, B) distribution en agrégats diffus C) distribution aliforme D) distribution en bande E) distribution confluyente F) distribution marginale. A,C et E présentent des parenchymes paratrachéaux B, D et F présentent des parenchymes apotrachéaux [4].

- Rayons : les rayons représentent une ou plusieurs couches de cellules de rayon de parenchyme (rayons appelés respectivement « uni- » ou « multi-sériés »). Généralement, les bois homoxylés possèdent des rayons unisériés, alors que les hétéroxylés peuvent posséder les deux. C'est dans cette partie du bois qu'est stocké l'amidon. En effet, une étude sur le peuplier a montré que 20 à 30 % des cellules sont occupées en hiver par des amyloplast, alors que les vacuoles, permettant d'y stocker les protéines, occupent 12 % de la cellule et que 1,1-1,4 % sont dédiés au stockage des lipides dans l'oléosome [8].

IV.1.5. Le bois : Un matériau structuré en trois-dimensions

Les cellules sont organisées dans le bois : en fonction de l'axe de la coupe, les informations récoltées seront donc différentes. Connaître l'histologie et l'agencement des cellules permet de reconnaître le type de coupe qui a été effectué. Le schéma en Figure 7 permet d'avoir une idée de l'angle de coupe correspondant à la description des coupes présentées par la suite.

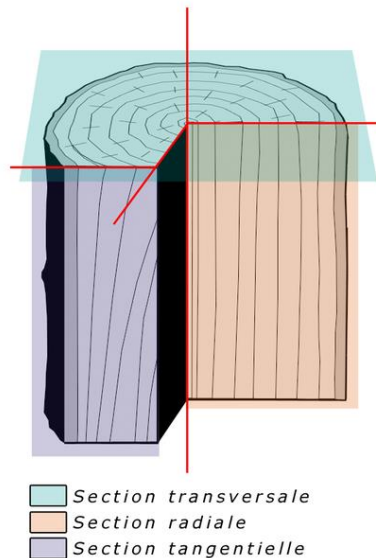


Figure 7 : Schéma des trois types de coupes pouvant être obtenus sur une tige.

- Coupe transversale

Le sommet du schéma de la Figure 8 représente une coupe transversale. La zone située entre les repères « 0 » et « 1a » représente le bois d'été, constitué de petites cellules de fibres non-fonctionnelles (d). La zone située entre les repères « 1a » et « 1b » représente le bois de printemps, constitué de larges cellules de fibres fonctionnelles (c). La zone située entre 0 et 1b représente un cerne. Les parenchymes axiaux (e) sont représentés ainsi que les cellules de rayon de parenchyme (les trainées perpendiculaires à l'anneau de croissance en 2a-2b, 2c-2d, et 2e-2f). Les liaisons entre cellules (ponctuations) sont de tailles différentes, qu'elles soient formées entre deux vaisseaux (f) ou d'un vaisseau à un rayon de parenchyme (g) ou encore, d'un vaisseau à une cellule fibre (h).

- Coupe radiale

Le côté gauche du schéma en Figure 8 représente une coupe radiale (II). On peut observer les épaissements d'un vaisseau (i), les fibres constituant le bois de printemps (c) et le bois d'été (d). On y voit aussi un rayon constitué de cellule de rayon de parenchyme (j).

- Coupe tangentielle

C'est le type de coupe que l'on observe sur le côté (III) de la Figure 8. Cet angle de coupe permet d'observer les rayons sur leur épaisseur (k), le creux d'un vaisseau (i), les fibres à parois épaisses du bois de printemps (c) et les pits entre fibres (m).

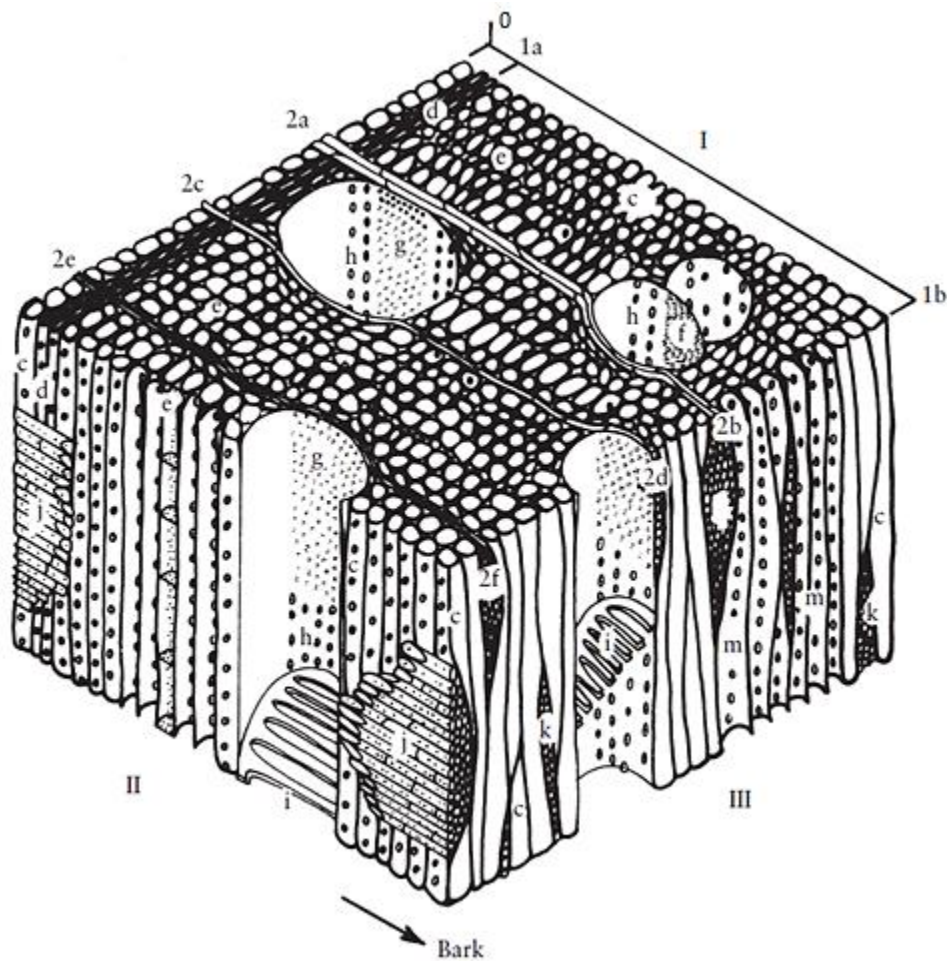


Figure 8 : Schéma d'une coupe transversale I, d'une coupe radiale II, et d'une coupe tangentielle III) Description dans le texte [4].

IV.1.6.Frontière aubier/duramen et duraminisation

- L'aubier

The International Association of Wood Anatomists (IAWA) définit l'aubier comme « la portion de bois qui contient des cellules vivantes et des matériaux de réserve » [9]. C'est un tissu perméable et plus humide que le duramen, sa fonction principale étant de transporter la sève brute des racines au houppier. Il permet aussi à l'arbre de stocker les composés carbonés provenant de la photosynthèse. Les cellules de parenchyme serviront, elles, à retenir l'amidon et les lipides. L'aubier permet aussi de répondre aux blessures en produisant plus de tissu ou de composés défensifs. Le cycle respiratoire des cellules de parenchyme constituant l'aubier nécessite une grande quantité de nutriments.

- La zone de transition

La définition de cette partie histologique du bois proposée par Hillis est « l'étroite zone légèrement colorée entourant le duramen et les régions endommagées. Souvent cette zone contient des cellules vivantes, dépourvues d'amidon. Elle est habituellement

imperméable à l'eau, avec une humidité plus faible que l'aubier et le duramen. » Cette zone de transition est appelée aussi zone blanche ou zone sèche [10].

- Le duramen

La définition du duramen proposée par l'IAWA est la suivante : « c'est la couche la plus interne du bois, qui durant la croissance de l'arbre, cesse de contenir des cellules vivantes ainsi que les matériaux de réserve tel que l'amidon [9]. Ces matériaux sont retirés ou transformés en substance de duramen. » Le duramen se distingue de l'aubier par sa couleur, sa faible perméabilité et l'augmentation de la résistance face aux détériorations.

- La duraminisation

La duraminisation est un phénomène utilisé par les plantes ayant une longue durée de vie. Le duramen se localise au centre du bois et ne possède pas de cellule vivante ni d'éléments de réserve. L'amidon y est ôté ou utilisé dans la biosynthèse des substances du duramen. Ces substances, telles que les polyphénols, permettent à l'arbre d'augmenter sa résistance aux nuisibles. Le duramen croît de la partie centrale vers la partie extérieure, il est supposé que ce sont les cellules de parenchyme situées dans la zone de transition qui initient le phénomène de duraminisation [11,12,13].

- Extractibles du duramen

Carroodus observe en 1971 une augmentation de la concentration en dioxyde de carbone au niveau du duramen, où des composés polyphénoliques commencent à être produits. D'autres équipes suggèrent que ce n'est pas le CO₂ mais l'éthylène qui serait responsable de la duraminisation. L'éthylène est connu pour augmenter l'activité enzymatique et est responsable de la production d'extractibles de types polyphénoliques [14].

Les extractibles, quant à eux, ne sont pas toujours responsables de la résistance de l'arbre contre les dégâts ou les nuisibles. De plus, certaines espèces contiennent plusieurs métabolites faiblement toxiques mais qui agissent en synergie. Dans la revue de Taylor et Gartner (2002), il est indiqué que la micro-distribution des extractibles a reçu moins d'attention à cause de la difficulté à les détecter *in situ* [15]. Les extractibles du bois sont décrits en session IV.1.7.

- Support structurel

L'aubier est plus important que le duramen pour le soutien structurel, car les tensions et les compressions s'opèrent au niveau du dernier cercle de croissance. Cependant, le duramen reste nécessaire pour le soutien des grands arbres où la surface de l'aubier est insuffisante pour fournir le support mécanique. Une certaine proportion aubier/duramen est nécessaire à l'arbre pour qu'il fournisse une résistance homogène face à la flexion provoquée par le vent [14].

- Recyclage de nutriments

Des études ont démontré que les arbres peuvent recycler leurs nutriments contenus dans le duramen pour les transmettre dans l'aubier. Le jeune duramen, contenant moins de nutriment, est donc moins attractif pour les pathogènes [15].

IV.1.7.Composition chimique du bois

Il est connu que les végétaux requièrent de l'eau et des sels minéraux pour croître correctement. Ensuite, à l'aide de la photosynthèse, ces végétaux synthétisent eux-mêmes leurs sucres par des voies métaboliques permettant la biosynthèse d'autres molécules comme les polymères de structure des cellules. Ces polymères de structures sont la cellulose, l'hémicellulose, la pectine et les lignines. L'amidon est utilisé pour stocker l'énergie. D'autres composés sont utilisés en tant que régulateurs de croissance, ou pour la stratégie de défense contre les nuisibles.

- La cellulose

La cellulose est un polymère de type polysaccharide, dont le motif est un glucose lié par des liaisons β -1,4. Cet élément représente 40 à 50 % en masse de la matière sèche du bois. Le degré de polymérisation de ce composé est déterminé par diffraction de la lumière et est compris entre 9000 et 10000. Une chaîne de 10000 unités représente une fibre de 5 μ m de largeur [16]. Sa structure, organisée en microfibrilles, est illustrée en Figure 9 :

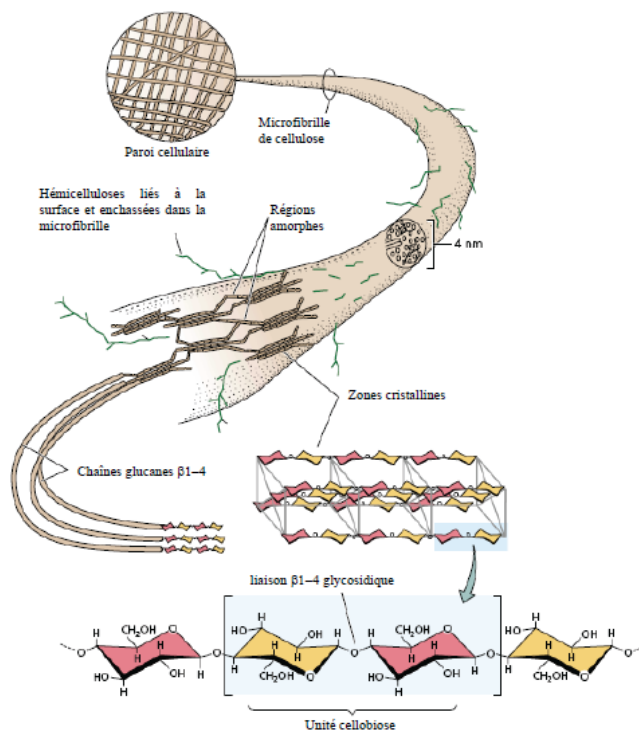


Figure 9 : Structure de la cellulose [3,16].

- L'hémicellulose

L'hémicellulose représente 25 à 35 % de la masse sèche du bois. C'est un polymère constitué d'unités de glucose, mannose, galactose, xylose, arabinose, d'acide 4-O-méthylglucuronique et d'acide galacturonique [16]. Contrairement à la cellulose qui est constituée de plusieurs milliers d'unités l'hémicellulose est composé de seulement une centaine de sucres. L'hémicellulose est la matrice de la cellule présente entre les microfibrilles et la lignine. Celle-ci a pour rôle d'apporter de la rigidité dans les cellules.

- La lignine

La lignine est une substance polyphénolique ayant pour précurseurs biosynthétiques les alcools paracoumarylique, coniférylique, et sinapylique. L'oxydation de la lignine à l'aide du nitrobenzène a permis de mesurer les abondances relatives des monomères, entre du bois hétéroxylé ou homoxylé. L'alcool paracoumarylique est le précurseur mineur de la lignine provenant du bois hétéroxylé et homoxylé. Dans le bois homoxylé, l'alcool coniférylique est majoritaire alors que dans le bois hétéroxylé, le rapport entre alcool coniférylique et sinapylique est variable [17]. La structure des monomères de la lignine et un modèle de structure de la lignine des bois homoxylés sont représentés en Figure 10 [18].

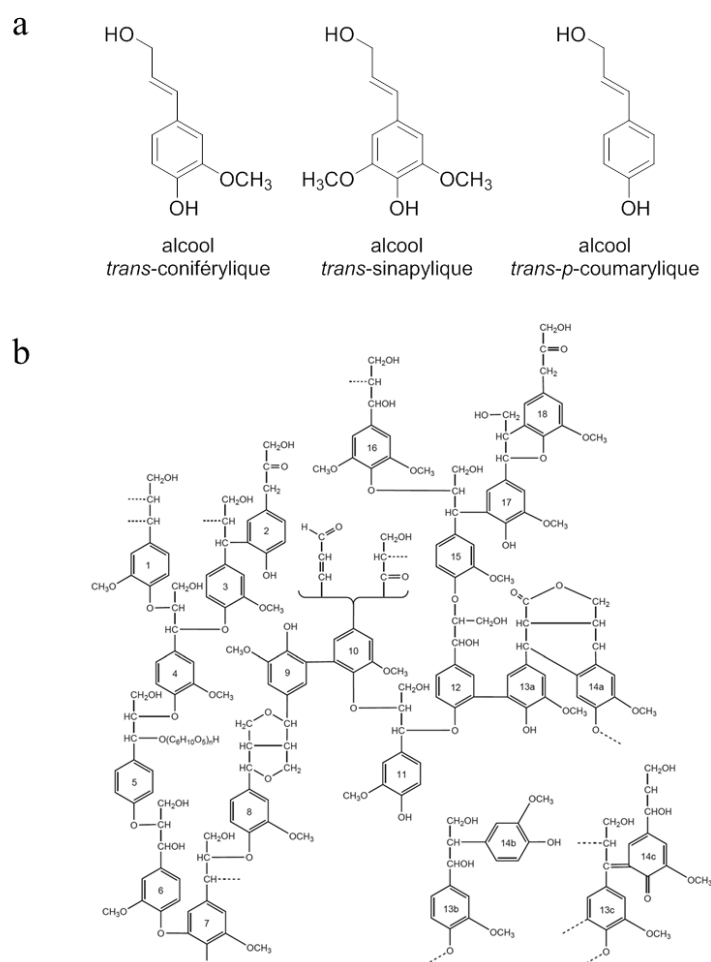


Figure 10 : a) structure des trois monomères de la lignine b) Modèle de la structure de la lignine de l'épinette proposé par Feudenberg [18].

- Les régulateurs de croissance

Afin d'assurer la différenciation cellulaire, les plantes emploient des hormones. Par exemple, l'auxine, la gibbérelline et l'éthylène sont des hormones responsables de la différenciation de cellules présentes dans le xylème secondaire, comme les fibres ou les vaisseaux. Les plantes utilisent aussi les peptides comme hormones de croissance [19].

- L'amidon

En automne, l'amidon synthétisé pendant le printemps et l'été est hydrolysé en raffinose et stachyose. Une basse température induit la conversion de l'amidon en sucres, lesquels vont être mobilisés pour l'adaptation de l'arbre lors de l'hiver, lorsque la photosynthèse chute [8,20]. L'amidon est composé de deux types de biopolymères. Il est majoritairement composé d'amylose, un polymère de D-glucose lié par des liaisons α -1,4 et d'amylopectine, qui présente des ramifications ponctuelles entre les glucoses par des liaisons α -1,6. Un schéma de ces deux structures est disponible en Figure 11.

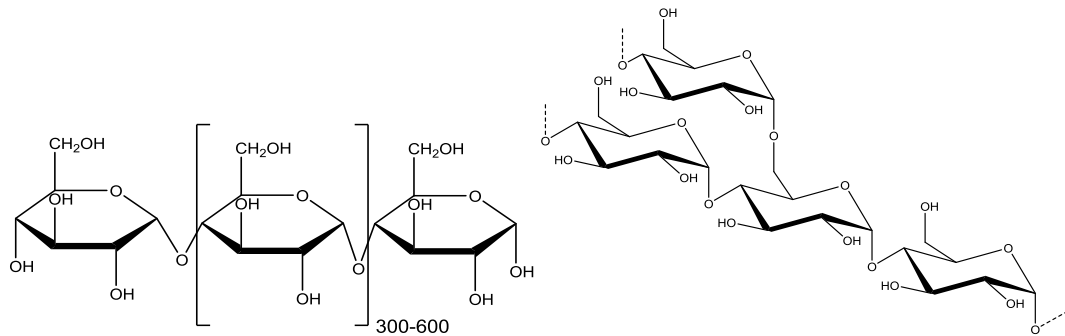


Figure 11 : Gauche : la structure de l'amylose ; Droite : la structure de l'amylopectine.

- La pectine

La pectine est un des composés constituant les lamelles mitoyennes. C'est un polymère d'acide uronique lié en 1,4. Ce polymère permet de retenir une grande quantité d'eau et a un pouvoir chélateur. Sa structure peut être acétylée et/ou méthylée (Figure 12) [21].

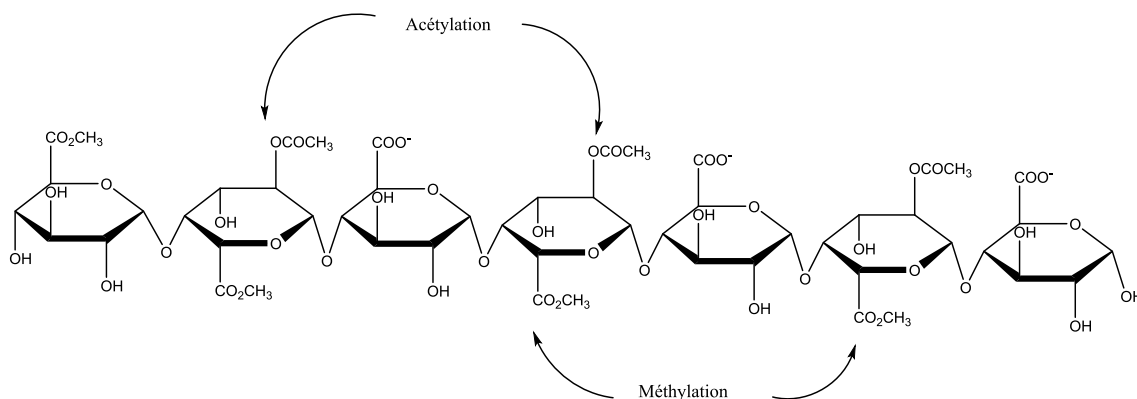


Figure 12 : Structure de la pectine [21].

- Les lipides

Les acides gras, tels que l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide oléique, les esters produits par combinaison entre acides gras et alcools (avec le glycérol par exemple), et les stérols, comme le sitostérol et le sitostanol, sont généralement plus présents dans l'aubier que dans le duramen. Les résines acides libres, telles que l'acide abiétique, sont majoritairement localisées dans le duramen [22].

- Les polyphénols

Les composés phénoliques sont des produits naturels d'une grande diversité, dont la synthèse implique un grand nombre de composés et de cascades enzymatiques. Ce sont des métabolites secondaires, sécrétés par des cellules spécialisées, peu impliquées dans la respiration ou la photosynthèse. Ces métabolites peuvent être employés par le végétal pour se défendre contre les nuisibles ou les rayonnements ultra-violets. Les composés phénoliques peuvent être des polyphénols, comme les tanins ou les flavonoïdes.

À titre d'exemple, un des polyphénols les plus importants du pin est la pinosylvine (illustrée en Figure 13), une substance très toxique contenue dans le duramen [23].

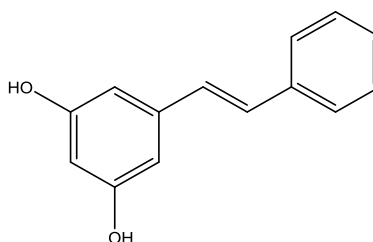


Figure 13 : Structure de la pinosylvine.

Dans de la sciure de *Diospyros burmanica*, les burmanines A à C ont été isolées : ce sont des dérivés des naphthols qui ont montré une activité contre le parasite *Leishmania spp.* [24].

Il existe trois types de tanins, les gallotanins (tanins hydrolysables), les ellagitannins (tanins hydrolysables) et les tanins condensés. Les gallotanins sont des esters polymériques d'unité d'acide gallique souvent associés avec des sucres. Les ellagitannins sont dus à la polymérisation d'unités d'acide gallique liées par des liaisons C-C autour d'un sucre. Les tanins condensés sont des polymères de flavanes[25].

- Les composés terpéniques

Les composés terpéniques sont des hydrocarbures constitués d'une succession de motif isoprène rencontrés dans le domaine végétal. L'espèce *Pinus ponderosa*, communément appelée pin jaune, a une composition riche en composés volatiles, tels que des monoterpènes (α -pinène, β -pinène, 3-carène, myrcène, limonène, β -phellandrène et terpinolène), des sesquiterpènes (α -longipinène, longifolène et germacrène), des diterpènes acides (acide abiétique, acide levopimarique, l'acide néoabiétique et acide palustrique), ainsi qu'un composé phénolique, l'estragol [26].

Les tropolones sont responsables de la durabilité du cèdre. Cette famille chimique inclue l'alpha, bêta et gamma-thujaplicine. On peut les classer dans la famille des monoterpénoïdes, la forme *bêta* est connue sous le nom d'hinokitiol ici illustré en Figure 14 [27].

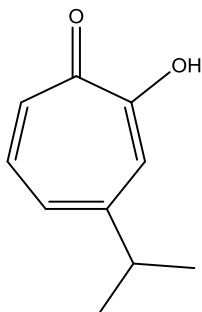


Figure 14 : Structure de l'hinokitiol.

- Les lactones

Deux lactones, appelées « rubrynolide » et « rubrérolide » (Figure 15) ont été extraites dans le xylème secondaire de l'espèce *Sextonia rubra*, un arbre de Guyane française [28].

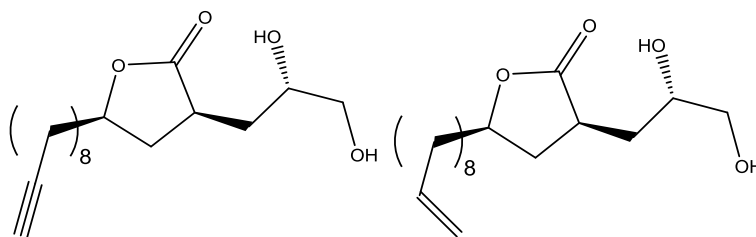


Figure 15 : De gauche à droite, les structures du rubrynolide et du rubrérolide.

Composition inorganique du bois

Les composés inorganiques présents dans le bois ont été peu étudiés. Ils sont puisés dans le sol par les racines et transportés par la sève brute. Les éléments les plus présents sont généralement le calcium, le magnésium et le potassium. Ces éléments sont probablement sous forme d'oxalate, de carbonate, de sulfate ou chélatés par les groupements carbonyles de la pectine [4].

IV.2. L'imagerie par spectrométrie de masse appliquée à l'étude du bois

En 2005 Saito *et al.* publient un article sur l'identification et la caractérisation des ions correspondant à de la lignine après irradiation d'une surface de bois par une source de gallium. Les fragments détectés permettent de distinguer les types de monomères constituant la lignine [29]. La même année et par la même équipe, un article a été sur la localisation par imagerie TOF-SIMS d'un diterpène phénolique (le ferruginol) entre l'aubier et le duramen du cèdre de Japon. Le ferruginol avait été détecté de manière homogène dans le duramen [30]. En 2007, la préparation d'échantillon de bois destinée à l'imagerie TOF-SIMS a été l'objet d'un article publié par Tokareva *et al.* Ce travail consistait à déterminer la composition en lignine et en éléments inorganiques au niveau des ponctuations présentes dans l'épinière de

Norvège. Mais la préparation d'échantillon proposée est exclusivement réservée à l'analyse des polymères de structure du bois et des éléments inorganiques. En effet pour retirer l'effet matrice induit par les extractibles du bois, une étape de lavage a été utilisée [31]. En 2008, la distribution spatiale de l'hinokinine a été étudiée pour discerner l'aubier du duramen dans du bois de cyprès japonais décoloré utilisé pour la construction de temple japonais. Il a été remarqué que l'hinokinine est localisée exclusivement dans les cellules de rayon de parenchyme et est plus abondante à la frontière entre la zone de transition et le duramen [32]. Ensuite, la même équipe publie un article portant aussi sur la duraminisation du même résineux mais en étudiant cette fois la distribution des lignines et des éléments inorganiques. Il a été observé une homogénéité dans la distribution des lignines mais une diminution de l'intensité de certains éléments comme le sodium, le magnésium et le calcium [33]. La Figure 16 illustre les formules brutes des ions fragments des différents monomères constituant la lignine.

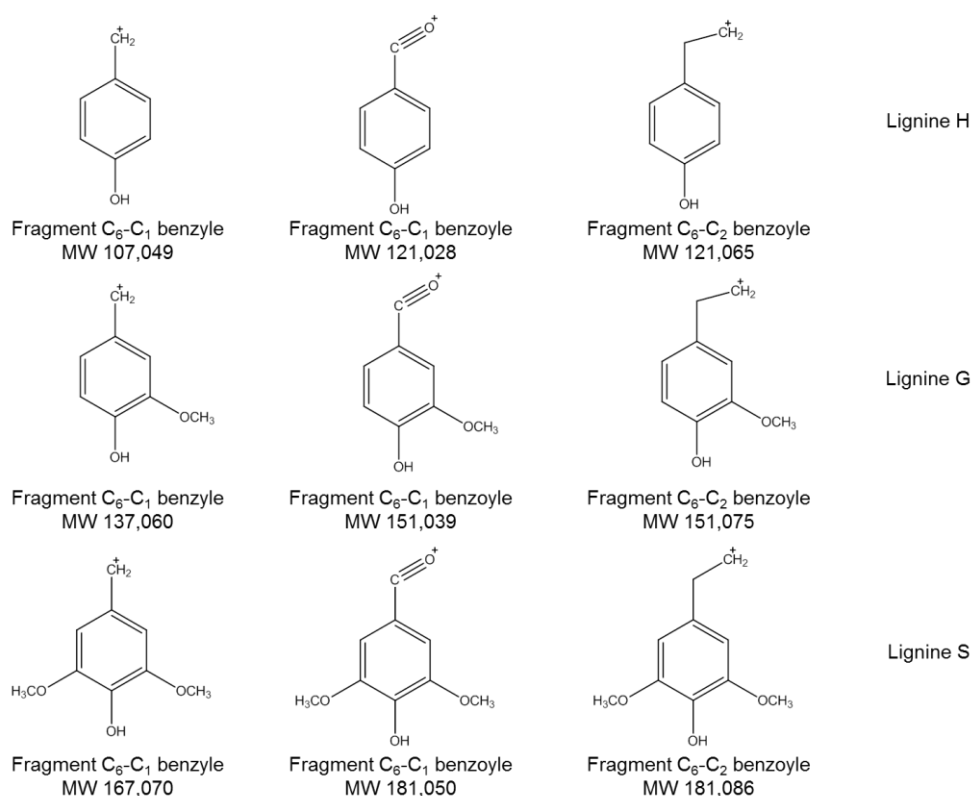


Figure 16 :Liste des formules brutes des fragments de lignine obtenus en TOF-SIMS [29,33].

En 2011, Goacher *et al.* ont publié un article où 44 ions ont été attribués soit à la lignine soit aux polysaccharides [34]. Zhou *et al.* ont publié leurs résultats sur la distribution des motifs G et S de la lignine entre deux cellules de parenchyme de peuplier (*Populus trichocarpa*) [35]. Pour cela, il a été nécessaire de nettoyer la surface à analyser avec un faisceau de fullerène pour retirer les dommages des cellules induits par la préparation d'échantillon (fixation au formaldéhyde-acide acétique-éthanol puis coupe au microtome). Des enrichissements en lignine G ont été observés au niveau de la lamelle mitoyenne. Ces résultats ont été illustrés en Figure 17. Les premiers résultats d'imagerie trois dimensions sur du bois en employant la technique *dual-beam* ont été publiés par Jung *et al.* en 2012 [36]. Cette technique a été appliquée à l'analyse de bois de tension présentant une couche G dans

la paroi secondaire des cellules. Une forte intensité des ions fragments de la cellulose a été mesurée dans la couche G alors que dans la couche S2 et dans le coin de cellule (lamelle mitoyenne et paroi primaire) le signal de la cellulose est plus faible. Ensuite, l'équipe de Kazuhiko Fukushima a mis au point un système cryo-TOF-SIMS/SEM pour une analyse de surface d'échantillon congelé de cèdre du Japon [37]. Cette technique a été utilisée pour détecter l'ion H_3O^+ afin de connaître la distribution de l'eau dans l'échantillon. En 2014, Saito *et al.* ont publié des résultats sur la localisation de l'aluminium dans de l'érable du Japon (*Acer micranthum*) [38]. Dans cet article, figure la distribution de l'aluminium et d'autres éléments inorganiques, dont le calcium. L'aluminium a été détecté dans les parois des cellules de parenchyme, à proximité des vaisseaux.

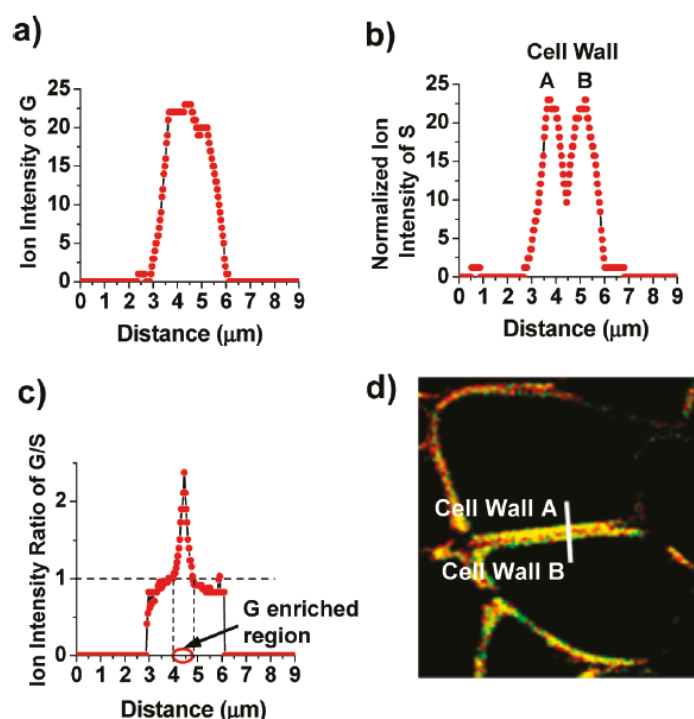


Figure 17 : Intensités des ions fragments caractéristiques de la lignine type G (a) et de type S (b) et rapport des intensités Lignine G/S (c) en fonction de la distance. Superposition deux couleurs des images ioniques correspondant aux ions fragments de la ligne G (en rouge) et de la ligne S (en vert). La ligne blanche représente la zone du balayage de a, b, et c [35].

Il a donc été montré que l'imagerie par spectrométrie de masse et surtout l'imagerie TOF-SIMS est efficace pour étudier la distribution spatiale de métabolites, d'éléments inorganiques et de polymères de structure du bois. C'est pourquoi cette méthode a été sélectionnée pour étudier les changements métaboliques s'opérant autour de la zone de transition d'une espèce tropicale appelée *Dicorynia guianensis*, connue aussi sous le nom d'Angélique en Guyane française et Basra Locus au Surinam. Cette espèce de la famille des Fabaceae-Caesalpinioideae est connue pour être l'une des espèces les plus exploitées en Guyane française (20000 m³ de grumes produites chaque année soit ~37 % de la production de bois) [39,40]. L'intérêt de cette espèce en sylviculture est que son duramen est considéré imputrescible. Le duramen de *D. guianensis* résiste aux champignons, est peu sensible aux termites ainsi qu'aux tarets (mollusques bivalves s'attaquant au bois). De plus, cette espèce est capable de supporter des tensions supérieures à celle du teck et du chêne blanc, à

l'exception de tensions perpendiculaires. Le rétrécissement entre le bois frais (dit le bois vert) et le bois sec est moins important que pour le chêne blanc. Le bois de *D. guianensis* contient en outre entre 0,20 et 1,70 % de silice.

À cause de la variation de couleur entre les différents individus, trois formes de *D. guianensis* ont été établis [41].

- La première forme est caractérisée par un duramen brun lorsque l'arbre est abattu et devient brun terne avec le temps. Cette forme est appelée Angélique gris.
- Un duramen violacé caractérise la seconde forme surnommée Angélique rouge.
- Lorsque le duramen est gris-clair l'arbre est appelé Angélique blanc ce qui forme le troisième type.

Ces différences de couleur de duramen sont attribuées à des différences environnementales et non pas génétiques [41].

IV.3. Méthodologie

IV.3.1. Analyse de standards de composés extrait de *D. guianensis*

Malgré son intérêt en sylviculture, la composition chimique de *D. guianensis* a été peu étudiée. Seule la présence de tryptamine comme métabolite a été rapportée ainsi que des produits isolés et caractérisés par l'équipe de Nadine Amusant. Cela a fait l'objet d'un article dans *Phytochemistry Letters* où quatre composés ont été extraits, et caractérisés par analyse structurale [42]. Ces composés sont des alcaloïdes indoliques dérivés de la tryptamine, les structures de ces molécules sont représentées en Figure 18. De plus, la catéchine et l'épicatéchine ont été détectées dans un extrait du duramen de *D. guianensis* [43]. Des standards de tryptamine, et de catéchine ont été analysés par TOF-SIMS afin de déterminer les pics des ions fragments majoritaires.

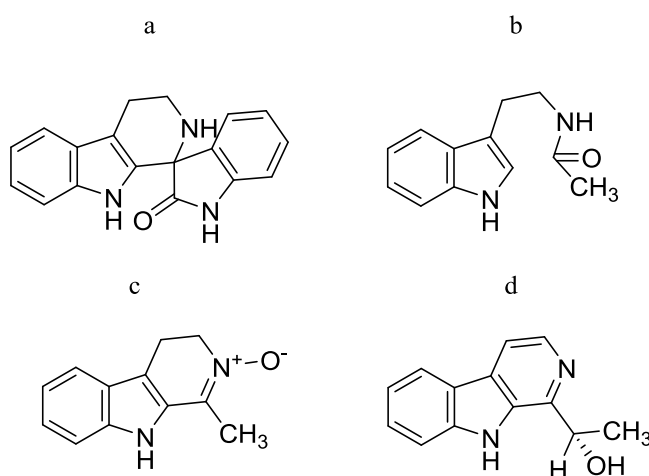


Figure 18 : Structure de quatre alcaloïdes indoliques isolés de *D. guianensis*. a) Dicorynamine b) N-Acétyltryptamine c) Harmalan-N-oxide d) Cordisinine C

IV.3.2.Préparation d'échantillon de bois pour l'imagerie par spectrométrie de masse

La préparation d'échantillon en imagerie par spectrométrie de masse est tout à fait cruciale car il est nécessaire d'obtenir une surface plane, sans y apporter de pollution, ni délocaliser les substances se trouvant au sein du matériau à analyser. La préparation d'échantillon de tissus mous comme du cerveau de rat est bien établie au laboratoire pour ce type d'analyse. Cependant, les tissus durs comme la plupart des tissus végétaux sont plus difficiles à couper. À L'ICSN, l'étude de la distribution de flavonoïdes dans l'enveloppe de graines d'*Arabidopsis thaliana* a nécessité de mettre au point une préparation d'échantillon particulière à cause de la petite taille et de la dureté de ces graines [44]. Pour cela, les graines ont été enduites dans une résine de polyester avant d'être coupées par le couteau de diamant d'un ultra-microtome. Cette méthode a été inspirée par celle utilisée au laboratoire pour l'analyse d'échantillons du patrimoine culturel, comme par exemple des prélèvements de tableaux anciens [45]. Les coupes n'étaient pas récupérables mais les surfaces coupées étaient planes, ce sont celles-ci qui avaient été analysées. Dans la présente étude, l'objectif de la préparation d'échantillon a été d'obtenir des surfaces planes de bois permettant de différencier les cellules entre elles. Mais le bois est un matériau particulier car il est structuré en trois dimensions et sa dureté peut être relativement élevée pour certaines espèces.

Pour la préparation d'échantillon, les premiers essais consistaient à couper le bois avec le matériel à disposition, c'est-à-dire uniquement un cryo-microtome. Cette technique nécessite de congeler l'échantillon à -20 °C. Le fait de congeler l'échantillon a rendu celui-ci impossible à couper en fine tranche sans casser le tissu ou émousser la lame en acier inoxydable.

Ensuite c'est un microtome fonctionnant à température ambiante qui a été employé pour préparer de fines sections de bois. Celui-ci a été coupé selon une orientation radiale ou transversale. Cependant, il a été impossible de couper le bois dans le sens transversal. Sous cette orientation, la lame est placée perpendiculairement aux fibres du bois qui apportent une résistance mécanique contraignant la coupe. La Figure 19a présente une image obtenue au microscope optique d'une coupe radiale de *D. guianensis* obtenue à l'aide d'un microtome.

Une autre méthode permettant d'obtenir une surface plane de bois est le polissage, au moyen d'un disque d'abrasif en rotation. Cette technique a été essayée, mais des poussières de bois bouchant les cellules sont produites durant le processus de polissage. En diminuant la granulométrie de l'abrasif et en utilisant de l'eau pour retirer au fur et à mesure le dépôt de poussière, le bouchage des cellules peut être limité. En revanche des contaminations au polydiméthylsiloxane ont été détectées après analyse TOF-SIMS (données non montrées). La Figure 19b présente une photographie d'une surface tangentielle de bois polis prise au microscope optique.

Une autre stratégie consistait à ramollir le bois à l'aide d'une petite quantité d'eau. Un morceau de bois (1 cm × 1 cm × 1 cm) a été déposé dans un bécher contenant ~50 mL d'eau de qualité Milli-Q. L'échantillon « trempe » dans cette eau jusqu'à ce que celui-ci coule. Ensuite, à l'aide d'un microtome des sections transversales de 14 µm d'épaisseur sont

facilement obtenues avec ce bois « ramolli ». La Figure 19c illustre une image prise au microscope optique d'une section transversale de *D. guianensis* : il est possible sur celle-ci de distinguer les cellules de parenchyme axial et radial, les fibres et les vaisseaux.

La dernière méthode qui a été mise en place est celle de l'ultra-microtomie. Cette technique est proche de la microtomie sauf que ce ne sont pas des lames en acier inoxydable ou en carbure de tungstène qui sont utilisées mais des couteaux de verre ou de diamant. Cette technique n'a pas permis d'obtenir de fines sections, mais de couper au fur et à mesure la surface d'un petit cube de bois afin de l'aplanir. Les couteaux de verre ont été les premiers à être testés car ils ne sont pas onéreux. Une surface de bois a été aplanie, mais les cellules ont été bouchées par de la poussière de bois, cela est illustré en Figure 19d. Finalement ce sont des couteaux en diamant qui ont permis d'obtenir des surfaces planes, sans boucher les cellules comme est illustré en Figure 19e. La différence de qualité entre les échantillons obtenus avec le couteau de verre et avec celui de diamant peut s'expliquer par la différence de dureté et la qualité de l'affutage des couteaux.

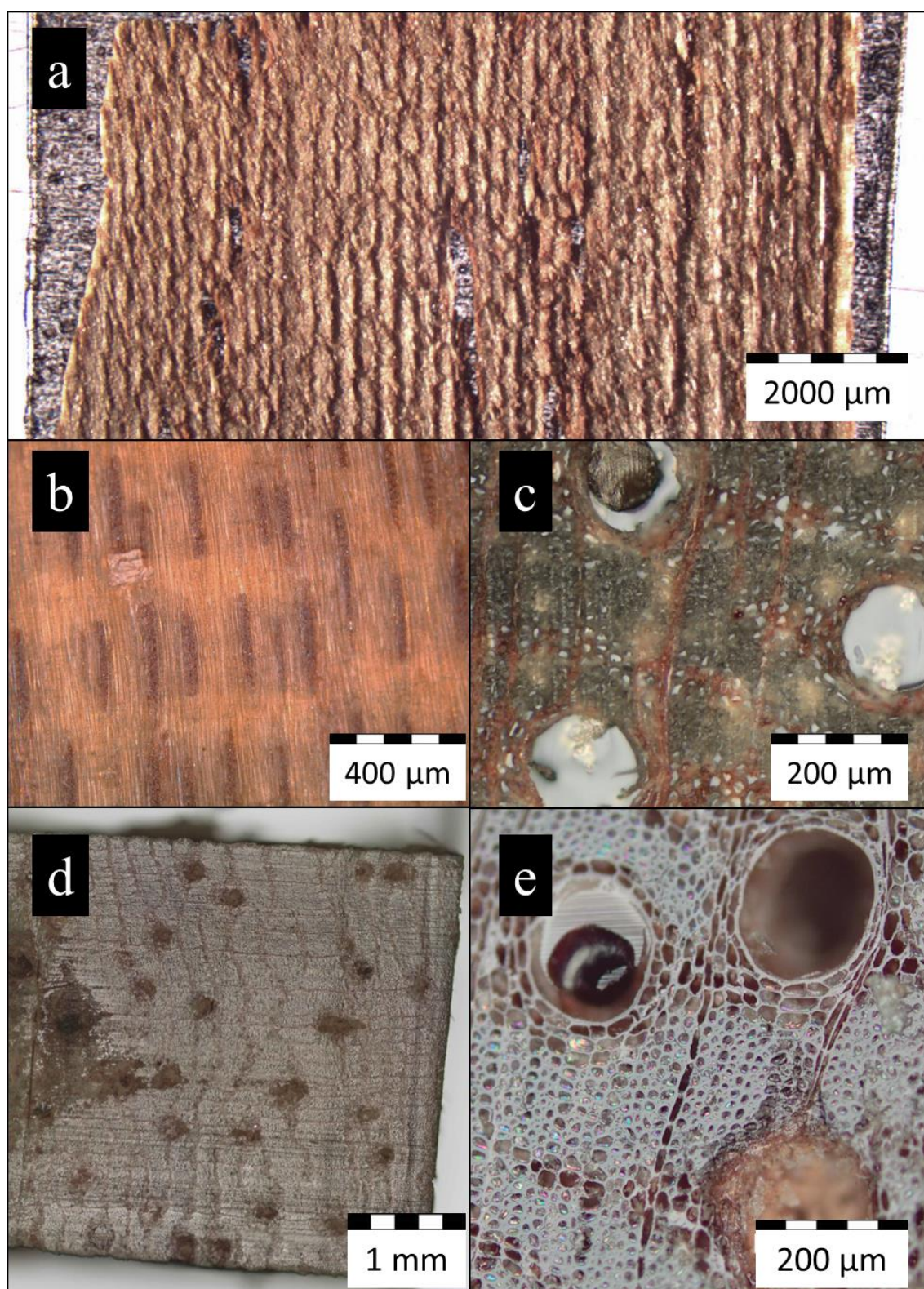


Figure 19 : Images au microscope optique de différentes méthodes de préparation de surface de *D. guianensis*. a) Coupe radiale au microtome. b) Surface tangentielle de *D. guianensis* poli c) Coupe transversale au microtome après ramollissement dans l'eau d) Surface « rabotée » avec un ultra-microtome équipé d'un couteau de verre e) Surface « rabotée » avec un ultra-microtome équipé d'un couteau de diamant.

À cause des pollutions de surface apportées par la méthode de polissage, celle-ci n'a pas été retenue. La méthode d'ultra-microtomie avec un couteau de verre n'a pas non plus été retenue à cause du bouchage des cellules.

IV.3.3.Choix de la méthode de préparation des coupes/surfaces transversales de bois

Deux méthodes permettant d'obtenir une surface transversale du bois ont donc été mises au point. La première consiste à ramollir le bois avec de l'eau et à le découper *a posteriori* à l'aide d'un microtome et d'obtenir des coupes de 14 μm d'épaisseur, et la seconde consiste à découper le bois petit à petit avec un ultra-microtome pour récupérer un bloc ayant une surface plane. Les échantillons obtenus avec ces deux méthodes ont été analysés puis comparés pour déterminer quelle est la méthode de préparation d'échantillon la plus appropriée pour notre étude. La Figure 20 montre avec ces deux méthodes les images de la somme de deux ions caractéristiques du calcium, Ca^+ et CaOH^+ , obtenue par imagerie TOF-SIMS. Une différence dans la distribution de ces ions a été constatée. Lorsque le bois est ramolli dans l'eau avant d'être coupé, le calcium a été détecté en dehors des cellules. Cependant, dans l'échantillon obtenu avec l'ultra-microtome le calcium a été détecté au sein des cellules. Il est fort probable que le fait d'employer de l'eau avant de couper l'échantillon délocalise certains composés, notamment les composés inorganiques. Souhaitant étudier les différences de la distribution spatiale ou de l'abondance de ces composés entre l'aubier et le duramen de *D. guianensis*, c'est la méthode basée sur l'ultra-microtomie qui a été retenue.

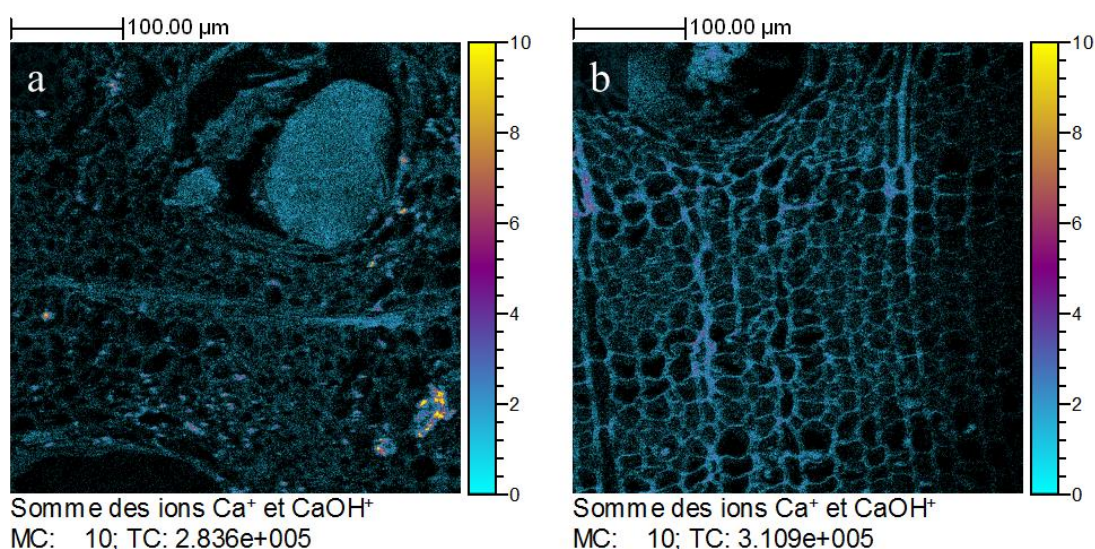


Figure 20 : Distribution de la somme des ions Ca^+ et CaOH^+ sur une coupe obtenue au microtome après ramollissement du tissu dans de l'eau (a), et pour une surface « rabotée » avec un ultra-microtome équipé d'un couteau de diamant (b).

Le couteau de diamant est un DIATOME Cryotrim 45° qui permet de préparer des surfaces planes, mais la taille de celui-ci limite celle des surfaces à 800 $\mu\text{m} \times 2500 \mu\text{m}$. Les différentes zones anatomiques étant séparées de plusieurs centimètres, il n'a pas été possible d'obtenir un échantillon contenant les différentes zones en même temps. Des blocs de bois ont alors été coupés à l'aide d'une scie à chantourner et de ciseaux à bois. La Figure 21 montre une photographie de l'échantillon présentant les différentes zones ayant été découpées pour être analysées. Chaque zone anatomique a été divisée en deux parties, soit une moins âgée et une plus âgée. Il a été distingué l'aubier naissant et avancé, la zone de transition naissante et celle avancée, ainsi que le duramen naissant et avancé. Cette appréciation entre les différentes zones s'est faite subjectivement en tenant en compte la couleur du tissu pour

délimiter les zones anatomiques, mais néanmoins avec l'aide des collègues spécialistes qui ont fourni ces échantillons. Le bois est ensuite retaillé avec une lame de rasoir sous une loupe binoculaire pour obtenir une pyramide ayant la taille acceptable pour le couteau de diamant. C'est un ultra-microtome EM UC06 disponible auprès de la plateforme IMAGIF qui a été employé pour couper la surface. La vitesse de coupe a été fixée à $2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$, et l'épaisseur des coupes à 500 nm, puis 200 nm lorsque la surface commence à être bien plane.

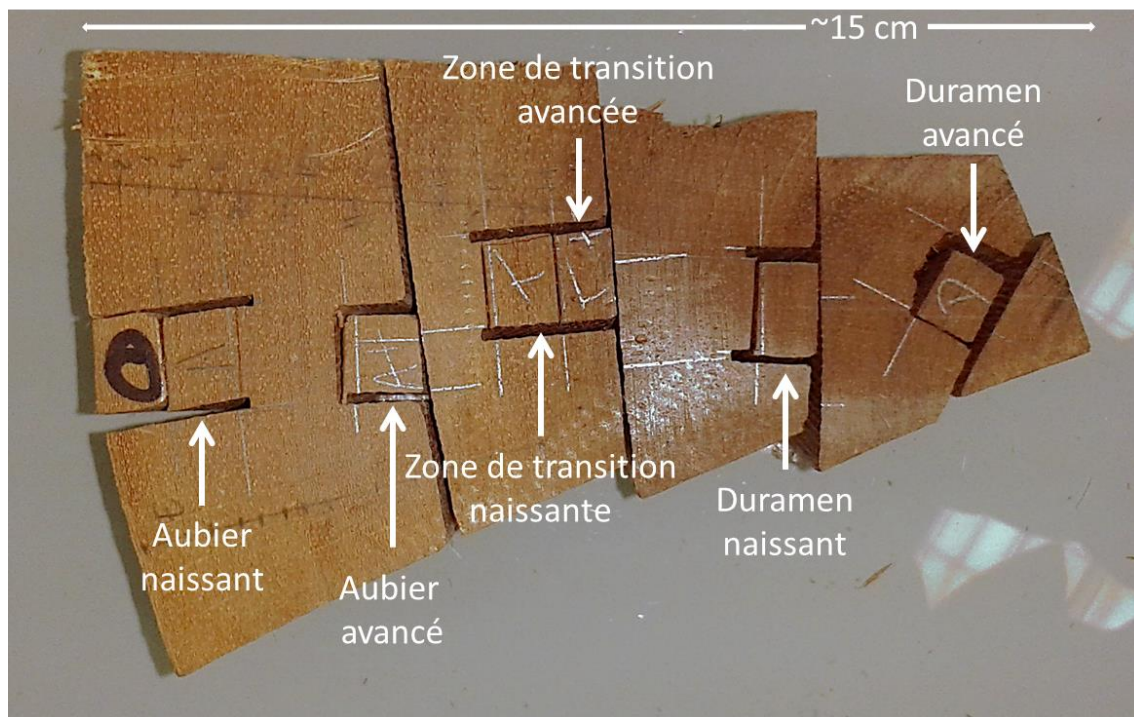


Figure 21 : Photographie de l'échantillon de *D. guianensis* et des zones découpées pour l'étude.

Il a ensuite été nécessaire de monter l'échantillon dans le porte échantillon du TOF-SIMS. Pour éviter que celui-ci ne dépasse pas trop du porte-échantillon, des rondelles ont été utilisées pour reculer celui-ci. Ensuite, l'échantillon est bloqué par des plaquettes intercalaires en aluminium pour le stabiliser avant d'être soutenu par des ressorts. Les différentes étapes de montage de l'échantillon sont illustrées en Figure 22.

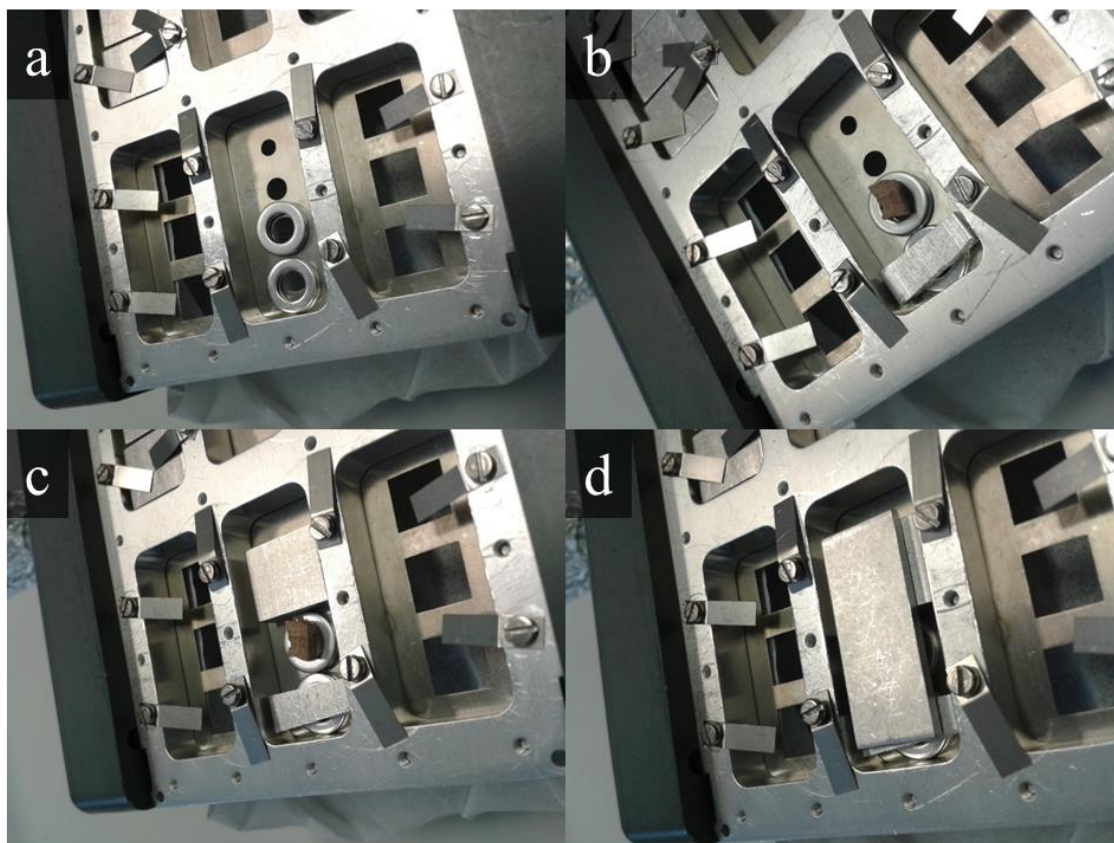


Figure 22 : Montage de l'échantillon a) des rondelles sont mises en place pour reculer l'échantillon afin qu'il ne dépasse pas trop. b) L'échantillon est placé. c) les plaquettes intercalaires en aluminium sont placées à côté de l'échantillon (elles doivent être à la hauteur de la base de l'échantillon). d) Une grande plaquette intercalaire en aluminium est utilisée pour maintenir l'échantillon avec des petits ressorts visibles sur les côtés.

IV.3.4. Analyse « stage scan » d'une surface radiale de *D. guianensis*

Les coupes obtenues dans l'orientation radiale avec le microtome ne sont pas inintéressantes. En effet, il a été possible avec cette technique de couper une large surface de l'échantillon. La coupe contient ainsi de l'aubier, la zone de transition et du duramen. De plus, il n'est pas nécessaire de ramollir l'échantillon avec de l'eau qui peut délocaliser certaines substances. Pour éviter des contaminations de surface, la lame en acier inoxydable a été préalablement nettoyée avec plusieurs lavages à l'éthanol pour retirer les graisses qui pourraient avoir été ajoutées par le fabricant. La Figure 23 montre une image obtenue au microscope optique, les différentes parties anatomiques du bois de *D. guianensis* ont été délimitées par des traits blancs pour distinguer le duramen, la zone de transition et de l'aubier. Le rectangle noir correspond à la zone qui a été analysée par TOF-SIMS selon le mode d'acquisition *stage scan* détaillé en partie II.1.7.d. Une zone de $8000\ \mu\text{m} \times 2000\ \mu\text{m}$ a été analysée avec un faisceau de Bi_3^+ focalisé en *high current bunched mode* avec une intensité de $0,21\ \text{pA}$ (mesurée avec un temps de cycle de $100\ \mu\text{s}$). La dose d'ion primaire utilisée est de $1 \times 10^{10}\ \text{ions} \cdot \text{cm}^{-1}$, la surface totale a été analysée en cinq scans et chaque pixel est obtenu après dix impulsions d'ions primaires.

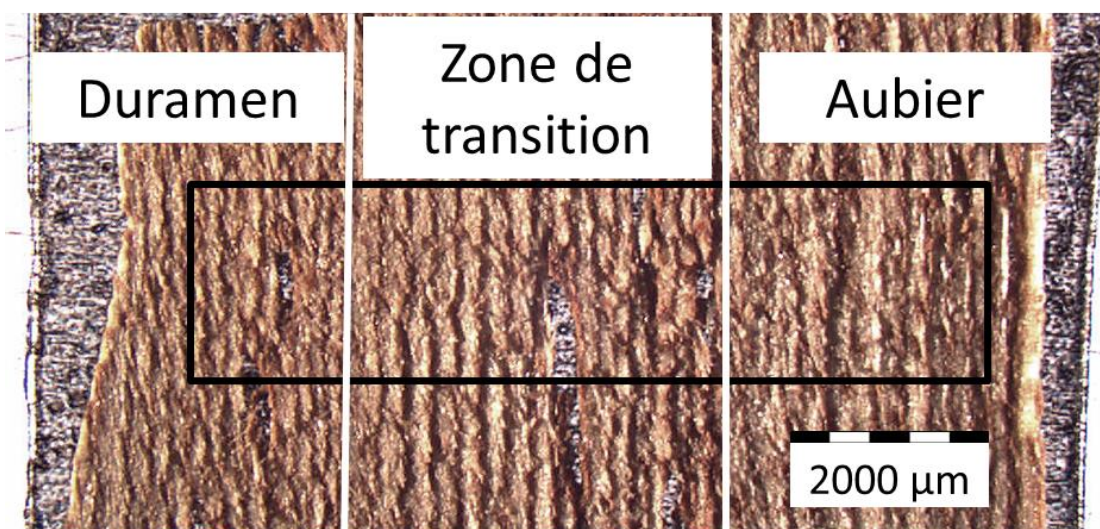


Figure 23 : Image de coupe radiale de bois. De gauche à droite, le duramen, la zone de transition et l'aubier. Le rectangle noir représente la zone qui a été analysée en mode *stage scan*.

IV.3.5. Application de la méthode *burst alignment + delayed extraction* aux échantillons de bois

Les surfaces obtenues avec l'ultra-microtome permettent d'observer les parois des cellules constituant le bois. Les exemples de la littérature montrent des images obtenues avec une haute résolution spatiale mais une résolution en masse unitaire. Comme il a été montré dans le chapitre précédent, ce mode ne permet pas de distinguer des ions ayant des rapports masse-sur-charge proches les uns des autres. La Figure 24 montre des spectres résultats de l'analyse d'une même surface en mode *burst alignment* sans (BA) et avec extraction retardée (BA+DE). Les spectres montrent que sans extraction retardée il n'est pas possible de distinguer CaOH^+ à m/z 56,97, $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}^+$ à m/z 57,03 et C_4H_9^+ à m/z 57,07. La superposition des images ioniques montre que les localisations des ions sont différentes. Ces résultats montrent l'intérêt de l'extraction retardée pour l'analyse TOF-SIMS d'ions organiques et inorganiques.

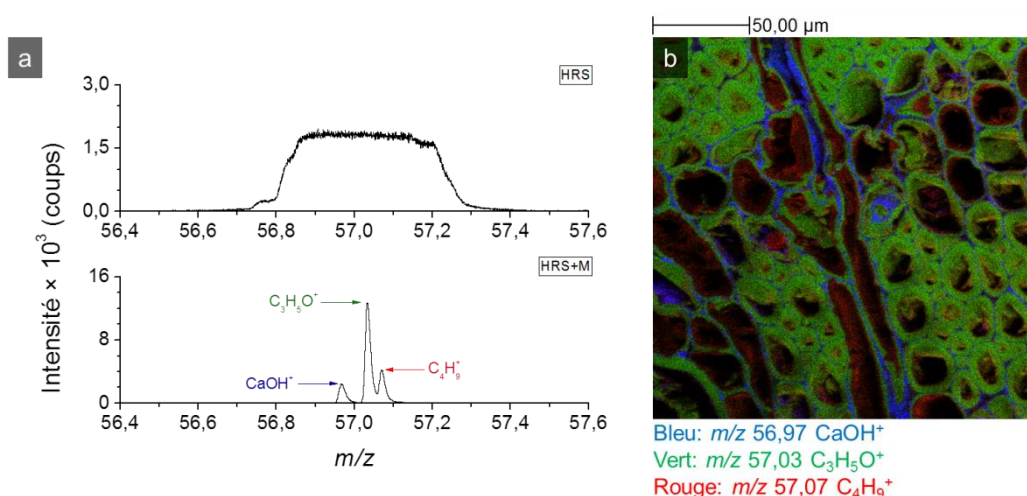


Figure 24 : a) Spectres de masse obtenus en mode *burst alignment* sans et avec extraction retardée. b) superposition trois couleurs des trois images ioniques correspondant aux ions CaOH^+ à m/z 56,97 (en bleu), $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}^+$ à m/z 57,03 (en vert) et C_4H_9^+ à m/z 57,07 (en rouge).

La méthode BA+DE a donc été employée pour optimiser la résolution en masse tout en gardant la résolution spatiale. Des images de $400\text{ }\mu\text{m} \times 400\text{ }\mu\text{m}$ ont été acquises avec un faisceau de Bi_3^+ ayant une durée d'impulsion de 100 ns et un courant de 0.074 pA (mesuré avec un temps de cycle de 100 μs). La dose d'ion primaire a été fixée à 4×10^{12} ions·cm⁻². L'extraction retardée a été fixée à 1,235 μs mais est en réalité, comme il a été décrit dans le chapitre précédent, de $\sim 100\text{ }\mu\text{s}$, soit égale à la durée d'impulsion des ions primaires. Il a aussi été mentionné que l'étalonnage en masse était plus difficile car en employant l'extraction retardée, la relation entre la racine carrée du rapport masse-sur-charge et le temps de vol n'est plus linéaire. Une comparaison a été effectuée entre les deux modes HCBU et BA+DE en analysant une même surface. La Figure 25 montre les parties de spectres de masse obtenus en HCBU et BA+DE et ayant été étalonnés avec la liste d'ions suivante : CH_3^+ ; H_3O^+ ; C_2H_3^+ , et C_3H_5^+ . Les ions légers comme K^+ et C_3H_3^+ ont une faible déviation en masse mais pour des ions plus lourds comme $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}^+$, une déviation en masse de 0,1 Da est observée entre les deux modes.

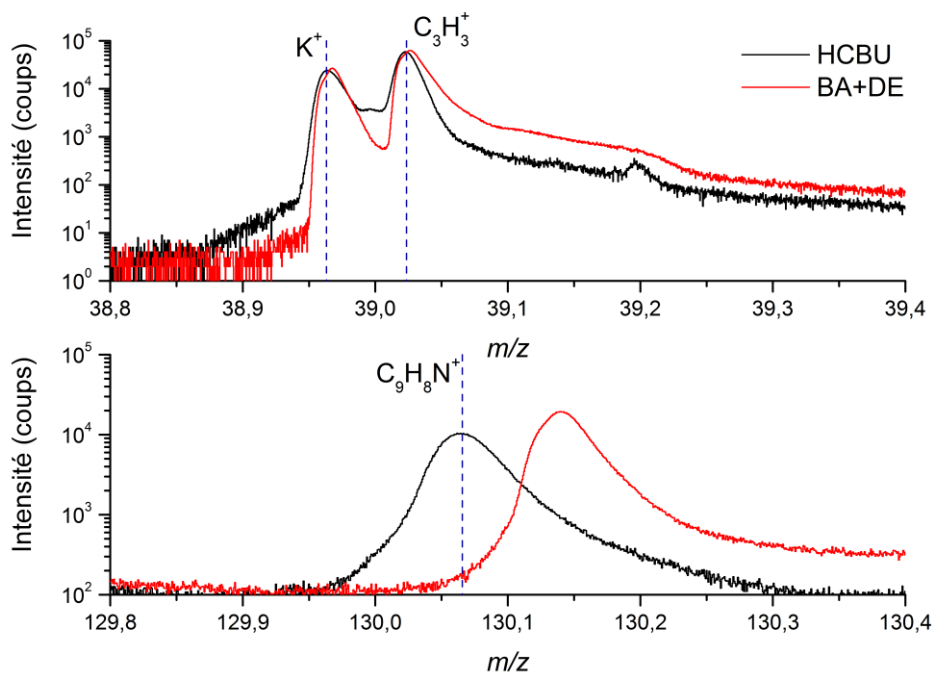


Figure 25 : Superposition des spectres de masse enregistrés en mode HCBU (noir) et en mode BA+DE (rouge), tous les deux ayant été étalonnés avec des ions « légers » (liste ci-dessus).

Ce problème d'étalonnage est dû au déficit en énergie cinétique des ions, qui est d'autant plus grand que ceux-ci sont « légers ». Pour résoudre ce problème d'étalonnage il a alors été proposé d'utiliser des ions plus lourds entourant la gamme de masse étudiée, comme cela est fait en MALDI. En 2011, Goacher *et al.* publient un article dans lequel de nombreux ions ont été attribués aux polymères de structure du bois. Souhaitant étudier les changements métaboliques autour de la zone de transition et non pas les polymères de structure, il a été admis d'employer certains de ces ions pour l'étalonnage. La Figure 26 montre le spectre de masse enregistré en mode HCBU et étalonné avec la liste d'ions décrite ci-dessus et le spectre de masse enregistré en mode BA+DE étalonné avec les ions C_7H_7^+ (m/z 91,05) ; C_7H_9^+ (m/z 93,07) ; $\text{C}_7\text{H}_{11}^+$ (m/z 95,09) ; C_8H_9^+ (m/z 105,07) ; et $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{O}_3^+$ (m/z 189,06). La

précision en masse est améliorée pour l'ion à m/z 130,07 $[\text{C}_9\text{H}_8\text{N}]^+$ lorsque des ions plus « lourds » sont utilisés pour l'étalonnage en masse. En revanche la précision en masse pour des ions plus légers, et situés en dehors de la gamme de masse des ions utilisés pour l'étalonnage, est dégradée.

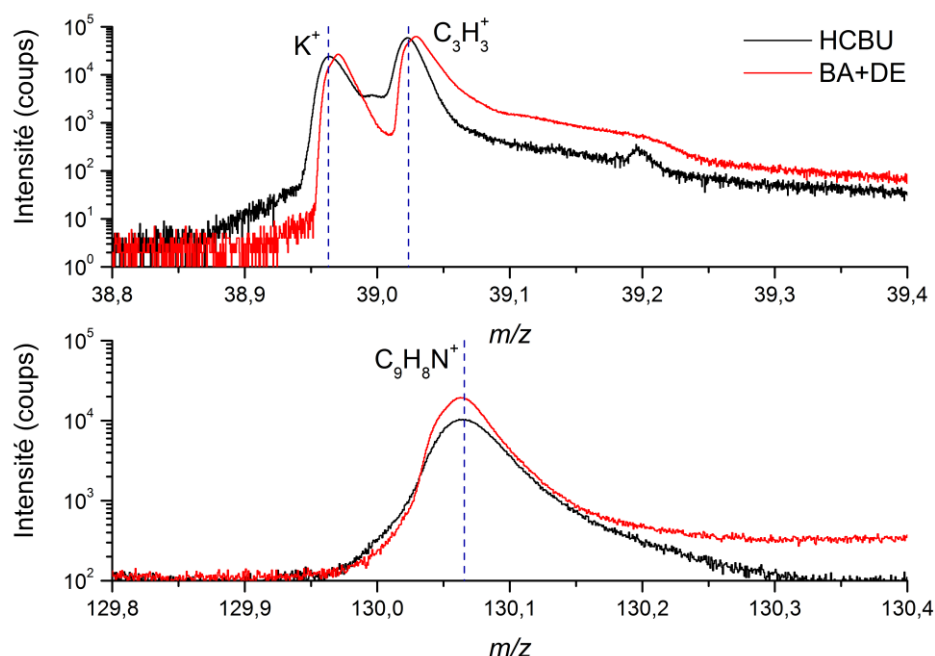


Figure 26 : Superposition des spectres de masse enregistrés en mode HCBU (noir) et en mode BA+DE (rouge), tous les deux étalonnés avec des ions « lourds ».

Le Tableau 1 récapitule les résolutions en masse et les précisions mesurées pour différents ions en mode HCBU et BA+DE. La résolution en masse obtenue avec le mode BA+DE est généralement meilleure que celle obtenue en mode HCBU (données non montrées). La résolution en masse de l'ion CH_3^+ en mode BA+DE est inférieure au millier. Cela est dû au déficit en énergie cinétique de cet ion au moment de l'extraction.

Formule	CH_3^+	CHO^+	CaOH^+	$\text{C}_9\text{H}_8\text{N}^+$	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_3^+$
m/z	15.02	29.00	56.97	130.07	167.07
Résolution en mass dans le mode HCBU (M/ Δ M, FWHM)	2376	2925	3128	2766	2420
Précision en masse dans le mode HCBU (ppm)	6	-5	-37	-15	-20
Résolution en mass dans le mode BA+DE (M/ Δ M, FWHM)	996	3374	4790	4470	4397
Précision en masse dans le mode HCBU (ppm)	620	29	-14	5	-50

Tableau 1 : Résolution et précision en masse mesurées pour les ions CH_3^+ ; CHO^+ ; CaOH^+ ; $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}^+$ et $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_3^+$.

Récemment, la nouvelle version 6.5 du logiciel SurfaceLab 6 permet de corriger, avec une option appelée *advanced TOF correction*, le temps de vol des ions secondaires pour des surfaces présentant une certaine topographie. Avec cette option, un algorithme permet de

calculer pixel par pixel un facteur de correction de la déviation moyenne du temps de vol. La Figure 27 présente des parties de spectres de masse enregistrés à la surface d'une coupe de *D. guianensis* avec et sans utilisation de la correction du temps de vol avant reconstruction des images. Une nette amélioration de la résolution en masse a été constatée.

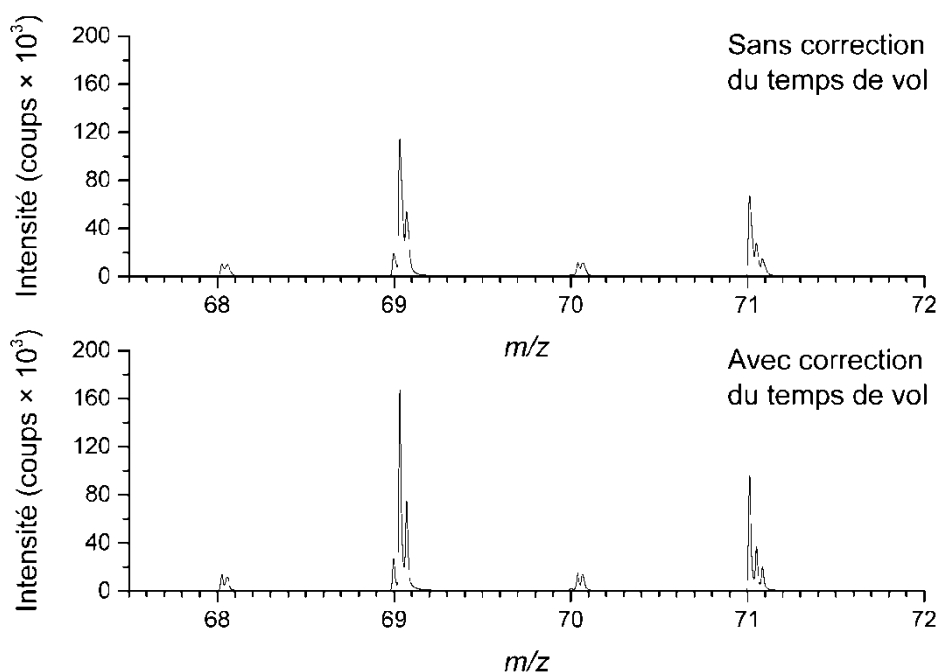


Figure 27 : Spectres de masse obtenus sans et avec correction du temps de vol.

Le Tableau 2 reporte les valeurs de la déviation standard et la résolution en masse pour différents ions avec et sans l'utilisation de la correction du temps de vol. Cette option permet d'améliorer la résolution en masse sans dégrader significativement la précision en masse de l'analyse.

		Avec correction du temps de vol		Sans correction du temps de vol	
Ion	Masse théorique	Déviati standard en ppm	Résoluti en masse FWHM	Déviati standard en ppm	Résoluti en masse FWHM
$C_7H_7O^+$	107,0500	-13,1	6236	-4,7	4659
$C_7H_5O_2^+$	121,0290	-13,2	6355	-6,6	4797
$C_6H_7O_3^+$	127,0400	17,3	3634	48,0	2663
$C_8H_9O_2^+$	137,0600	-24,8	5187	-31,4	3776
$C_8H_7O_3^+$	151,0400	-37,7	3599	-39,7	2627
$C_8H_9O_3^+$	153,0490	31,4	3806	43,1	2889
$C_9H_9O_3^+$	165,0590	-19,4	3670	3,6	2984
$C_9H_{11}O_3^+$	167,0710	-50,9	4397	-62,9	3526
$C_9H_9O_4^+$	181,0500	-46,4	3589	-51,4	2715

Tableau 2 : Mesure des erreurs standards en ppm pour les spectres de masse obtenus avec ou sans correction du temps de vol.

Cette méthode permet d'effectuer une meilleure sélection des pics ainsi, les effets d'ombres sont atténués comme cela a été présenté en Figure 28a où l'algorithme de correction du temps de vol n'est pas utilisé avant reconstruction contrairement à la Figure 28b où dans ce cas l'algorithme a été utilisé.

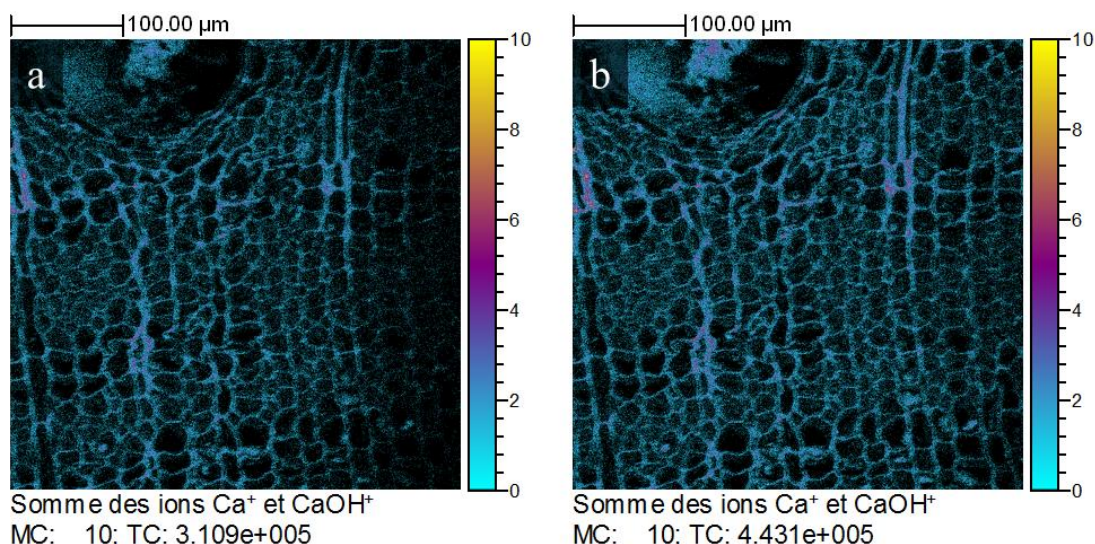


Figure 28 : Images de la distribution de la somme des ions Ca^+ et CaOH^+ avant et après correction du temps de vol (la correction permet en fait une meilleure sélection des pics).

Il existe aussi une option de traitement d'image permettant de corriger un éventuel décalage dans le positionnement des pixels (décalage de la position du faisceau d'ions primaires). Cette fonction, appelée *shift correction*, permet de recalrer les images des différents scans en choisissant le premier comme référence. L'algorithme choisit un motif sur lequel il va recalrer toutes les images. Le résultat attendu est une amélioration de la netteté de l'image. L'application du *shift correction* est plus populaire pour l'imagerie en trois dimensions où les temps d'analyse peuvent excéder dix heures. Dans cette étude, chaque image obtenue en mode BA+DE a nécessité quatre heures d'analyse. Cette option a alors été essayée, la Figure 29 montre la différence de netteté de la superposition des deux couleurs de la somme des fragments de la lignine et de la somme des fragments de polysaccharide respectivement en rouge et vert. Sur l'image corrigée, il est possible d'observer des ponctuations au sein de certaines cellules. Sur l'image non-corrigée, ces ponctuations sont plus difficiles à observer.

IV.1.1. Analyse d'une coupe radiale de *D. guianensis*

L'analyse de la coupe radiale de *D. guianensis* a permis de détecter simultanément des ions inorganiques, des fragments caractéristiques des polymères de structure du bois et les fragments caractéristiques de la tryptamine. Les Figure 31a et b montrent la distribution spatiale du sodium et du potassium : ces ions ont été détectés majoritairement dans l'aubier et dans la zone de transition. Le duramen contient peu d'inorganiques. Grâce aux attributions de Saito *et al.* et Goacher *et al.* il a été possible de rechercher dans les spectres les fragments caractéristiques de la lignine de type G à m/z 137,06 $C_8H_9O_2^+$ et m/z 151,05 $C_8H_7O_3^+$ ainsi que de la lignine de type S m/z 167,07 $C_9H_{11}O_3^+$ et m/z 181,06 $C_9H_9O_4^+$ [29,34]. Les fragments correspondant à la lignine de type H n'ont pas été détectés. Après avoir vérifié la corrélation spatiale entre les fragments de ces lignines, les images de chacun de ces ions ont été additionnées. La somme des ions fragments des lignines est présentée en Figure 31c et est répartie de façon homogène de l'aubier au duramen. Un ion fragment de cellulose a été détecté à m/z 127,04. Attribué à $C_6H_7O_3^+$, la distribution spatiale de cet ion, comme il est montré en Figure 31d, est corrélée à celle de la lignine. Ces résultats indiquent que les polymères de structure du bois ne sont pas modifiés lors de la duraminisation. Dans le spectre de masse total, des ions caractéristiques de la tryptamine ont été détectés à m/z 130,07 et à m/z 144,08 et attribués d'après le spectre de masse du standard à $C_9H_8N^+$ et $C_{10}H_{10}N^+$. La Figure 31e illustre la somme de ces ions de la tryptamine : celle-ci est détectée dans la zone de transition et plus abondamment dans le duramen.

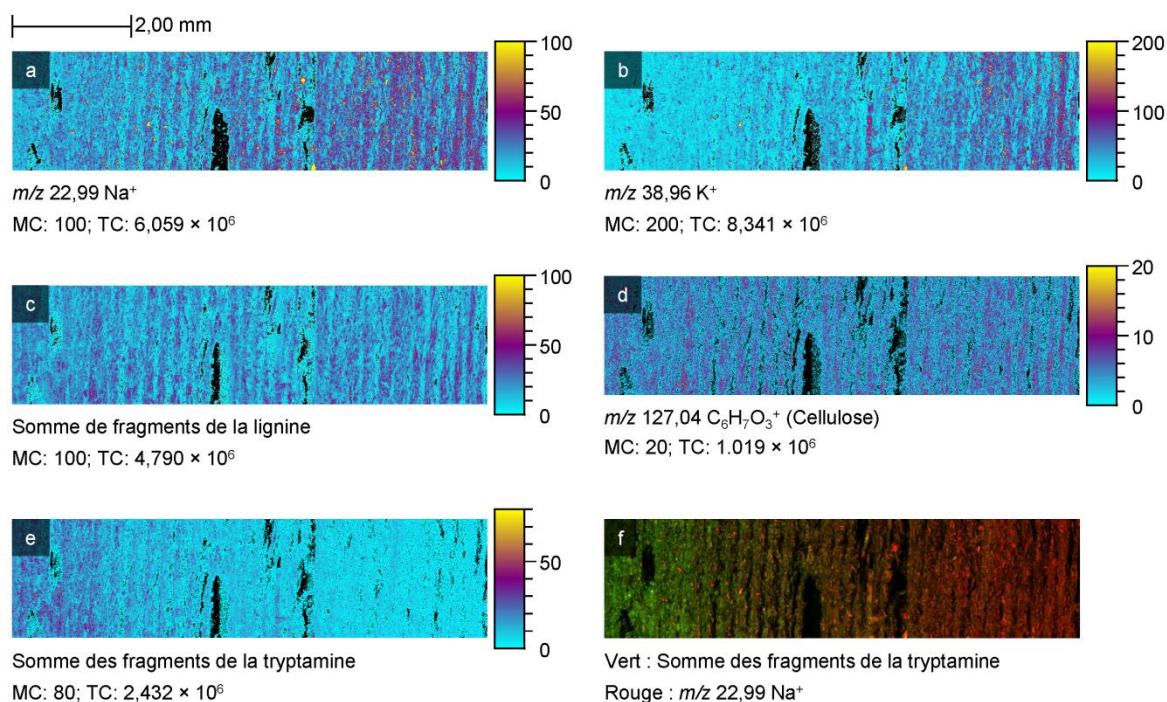


Figure 31 : Images ioniques d'une coupe de *D. guianensis* obtenues à l'aide d'un microtome a) Na^+ à m/z 22,99 b) K^+ à m/z 38,96 c) somme des ions fragment de la lignine d) ion fragment de la cellulose e) somme des ions fragments de la tryptamine f) superposition deux couleurs du sodium (rouge) et de la somme des ions fragments de la tryptamine (vert).

L'analyse d'une coupe radiale de bois a permis de déterminer une diminution des ions organiques comme le sodium et le potassium dans le duramen, contrairement à la tryptamine qui est détectée dans la zone de transition avant d'être abondante dans le duramen.

Une hypothèse est que les ions inorganiques nécessaires au développement du bois sont ôtés des cellules avant l'apoptose. Ce phénomène permettrait notamment à l'arbre de croître sur des sols pauvres et/ou de rendre le duramen moins intéressant d'un point de vue nutritif pour les organismes xylophages. Ceci a déjà été proposé dans la littérature [15]. Cependant, analyser une coupe radiale de bois à une résolution spatiale de 8 μm ne permet pas d'obtenir les informations à l'échelle cellulaire, ni de savoir si ce sont des cellules spécialisées qui sécrètent la tryptamine. Il a alors été nécessaire d'obtenir des coupes transversales de bois et de les analyser à une résolution spatiale inférieure au micromètre.

IV.1.1. Analyse d'une surface transversale de *D. guianensis*

Les coupes transversales de *D. guianensis* ont été analysées à l'aide de la méthode BA+DE. Il a ainsi été possible d'obtenir des cartes de densité ionique à l'échelle cellulaire et une bonne attribution des ions. Sur les différentes coupes, des ions inorganiques, des fragments caractéristiques des lignines, des polysaccharides et de la tryptamine ont été détectés. Le Tableau 3 résume la liste des ions détectés, ce tableau contient la formule, la masse théorique et la déviation standard en ppm de chaque ion détecté en mode positif. Les déviations standards en ppm sont relativement basses malgré l'utilisation de l'extraction retardée. Cela montre que cette méthode peut être appliquée à différents types d'échantillons à condition de connaître au préalable la composition de celui-ci, au moins en partie, pour utiliser des ions entourant la gamme de masse étudiée.

Fragments caractéristiques des lignines				Fragments caractéristiques des polysaccharides			
Ion	Masse théorique	Masse mesurée	Déviaton standard en ppm	Ion	Masse théorique	Masse mesurée	Déviaton standard en ppm
$C_4H_3^+$	51,024	51,022	-29,4	CH_3O^+	31,018	31,020	51,6
$C_5H_3^+$	63,024	63,023	-15,7	$C_2H_5O^+$	45,034	45,033	-13,3
$C_5H_5^+$	65,039	65,04	7,7	$CH_3O_2^+$	47,013	47,011	-48,9
$C_5H_7^+$	67,055	67,056	17,9	$C_2H_3O_2^+$	59,013	59,013	1,0
$C_6H_5^+$	77,039	77,038	-10,4	$C_2H_4O_2^+$	60,021	60,02	-13,3
$C_6H_9^+$	81,070	81,071	2,5	$C_2H_5O_2^+$	61,029	61,029	-8,2
$C_7H_7O^+$	107,050	107,049	-10,3	$C_3H_3O_2^+$	71,013	71,014	4,2
$C_9H_7^+$	115,055	115,05	-45,2	$C_3H_5O_2^+$	73,029	73,028	-17,8
$C_7H_5O_2^+$	121,029	121,028	-10,7	$C_5H_5O^+$	81,034	81,034	2,5
$C_8H_9O^+$	121,065	121,064	-13,2	$C_4H_3O_2^+$	83,013	83,012	-13,3
$C_8H_9O_2^+$	137,060	137,057	-24,1	$C_4H_5O_2^+$	85,029	85,029	-3,5
$C_8H_7O_3^+$	151,040	151,037	-19,9	$C_4H_7O_2^+$	87,045	87,044	-9,2
$C_8H_9O_3^+$	153,055	153,055	-2,0	$C_5H_5O_2^+$	97,029	97,029	-3,1
$C_9H_9O_3^+$	165,055	165,056	2,4	$C_5H_7O_2^+$	99,045	99,044	-10,1
$C_9H_{11}O_3^+$	167,071	167,064	-40,1	$C_4H_5O_3^+$	101,024	101,023	-9,9
$C_9H_9O_4^+$	181,050	181,047	-19,3	$C_6H_5O_2^+$	109,029	109,028	-9,2
				$C_5H_5O_3^+$	113,024	113,024	4,4
				$C_6H_7O_3^+$	127,040	127,043	25,2
				$C_6H_9O_4^+$	145,050	145,052	10,3

Tableau 3 : Ions fragments attribués à la lignine et aux polysaccharides d'après Goacher *et al.* La masse théorique, la masse calculée et la déviaton standard en ppm des ions détecté lors des expériences en BA+DE.

Les images individuelles des ions des polysaccharides et des lignines ont été reconstruites pour tous les échantillons. La Figure 32 illustre la distribution des ions des lignines et des polysaccharides pour les différentes zones. Sur les Figure 32a et b, des structures riches en polysaccharides au sein des cellules de parenchyme de l'aubier ont été détectées. Il est probable que ces structures correspondent aux réserves d'amidon.

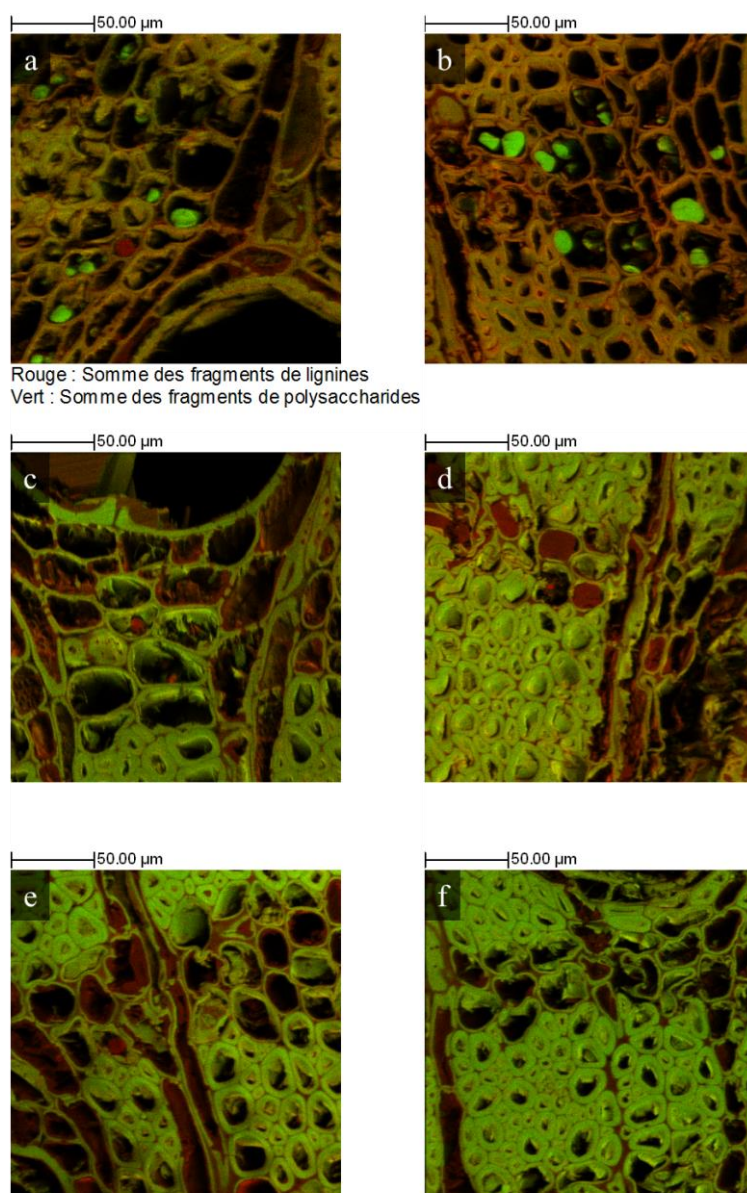


Figure 32 : Superposition deux couleurs de la somme des ions fragments de la lignine (en rouge) et de la somme des ions fragments des polysaccharides (en vert). Les images ioniques proviennent des différentes parties de *D. guianensis*. a) aubier naissant b) aubier avancé c) zone de transition naissante d) zone de transition avancée e) duramen naissant f) duramen avancé. Les images ont été rognées pour « zoomer » sur une zone de 200 µm × 200 µm afin de mieux montrer les cellules à proximité d'un vaisseau.

Pour vérifier cela, des régions d'intérêt ont été dessinées sur ces structures. La Figure 33 montre le spectre de masse en mode négatif de la ROI correspondant aux structures riche en polysaccharide dans l'aubier avancé. Des pics à m/z 221,07 ; 383,13 ; 545,17 ; 707,23 et 869,28 ont été détectés. En 1997, Baldwin *et al.* ont analysé la surface de granules d'amidon par TOF-SIMS, et une liste d'ions fragments avait été attribuée à l'amidon [46].

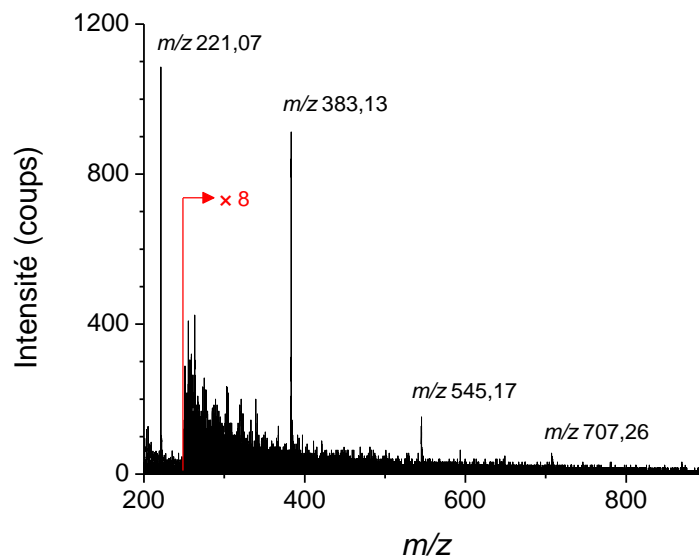


Figure 33 : Spectre de masse en mode négatif de la ROI des zones suspectées contenir de l'amidon.

Il s'agit d'un glucose répété n fois. La Figure 34 présente le motif de ce fragment et le Tableau 4 reporte la formule brute, la masse théorique, la masse mesurée et l'erreur standard des ions détectés. Ces ions ont aussi été détectés dans le spectre d'une ROI de parois de cellules de fibre (données non montrées). Dans ce cas, ces ions correspondraient plutôt à la fragmentation de la cellulose qui ne diffère que dans l'orientation de la liaison anomérique des glucoses. Ces structures disparaissent dès la première zone de transition. Il a été écrit dans la littérature que l'amidon n'est pas présent dans la zone de transition ni dans le duramen. L'amidon est la source d'énergie du bois, permettant un apport lorsque la photosynthèse diminue. Il est aussi impliqué dans la synthèse des extractibles. De plus son absence augmente la durabilité du bois car l'amidon est nécessaire pour la croissance de souches microbiennes fongiques et est nécessaire pour la reproduction de certains coléoptères [13,15].

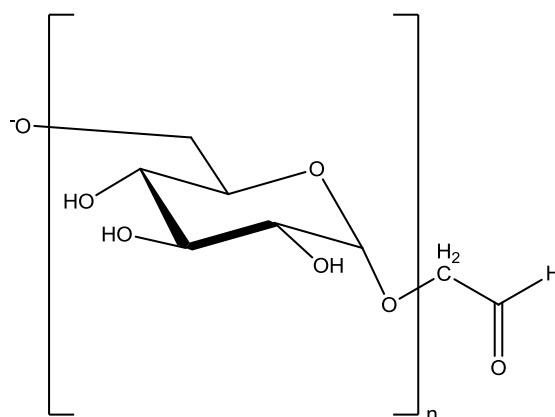


Figure 34 : Structure du motif des ions fragments de l'amidon détectés en mode négatif.

Nombre d'unité	Formule	Masse théorique	Masse mesurée	Déviati��n standard (ppm)
1	$C_8H_{13}O_7^-$	221,066	221,071	22
2	$C_{14}H_{23}H_{12}^-$	383,119	383,126	18
3	$C_{20}H_{33}O_{17}^-$	545,172	545,169	-5
4	$C_{26}H_{43}O_{22}^-$	707,225	707,263	54
5	$C_{32}H_{53}O_{27}^-$	869,277	869,229	-56

Tableau 4 : Formule brute, masses théoriques et mesurées et déviati  n standard en ppm des ions fragments de l'amidon détecté en mode négatif.

La distribution des ions de la tryptamine et des éléments inorganiques ont ensuite été comparées entre les différentes zones. La Figure 35 montre la distribution de la somme des ions fragments de la tryptamine précédemment décrits. Dans l'aubier, ces ions sont peu détectés, et leur intensité croît au niveau de la zone de transition naissante, sans qu'ils soient spécifiquement localisés dans un type de cellule particulier. Dans la zone de transition avancée, les ions fragments de la tryptamine sont détectés avec une grande intensité et localisés dans le lumen des cellules de parenchyme. Une diffusion de la tryptamine est ensuite observée car ces mêmes fragments sont détectés non plus dans le lumen des cellules de parenchyme, mais dans les parois de toutes les cellules du duramen naissant. Dans la littérature, il est mentionné que les extractibles du bois sont plus efficaces s'ils imprègnent les parois cellulaires. Dans le duramen avancé cette tryptamine est toujours détect  e mais est moins abondante, peut-être parce que celle-ci a été d  grad  e au cours du temps. Il est connu que le cœur au centre des vieux arbres est plus sensible aux attaques des nuisibles, formant alors ce qui est appel  e un arbre creux. Il existe des individus de *D. guianensis* qui sont des arbres creux : il est probable qu'au cours du temps la tryptamine ainsi que d'autres métabolites toxiques ne sont plus présents et n'assurent plus la protection des tissus les plus vieux.

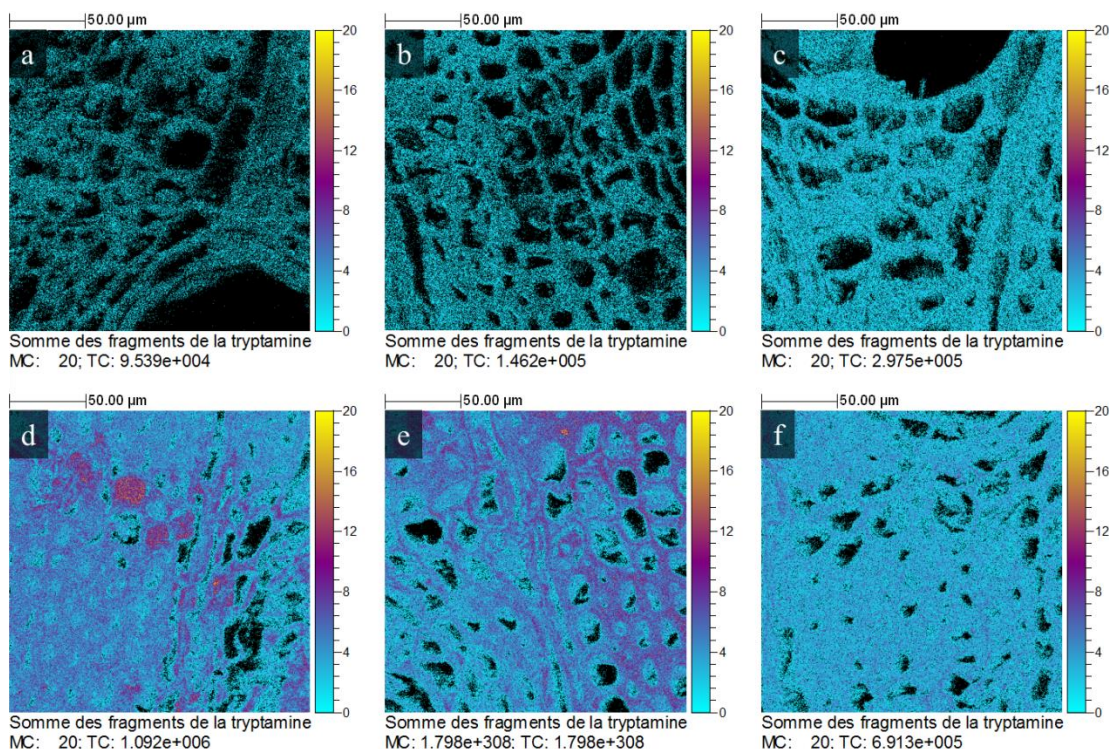


Figure 35 : Distribution des ions fragments de la tryptamine pour les différentes zones étudiées a) aubier naissant b) aubier avancé c) zone de transition naissante d) zone de transition avancée e) duramen naissant f) duramen avancé. Les images ont été rognées pour « zoomer » sur une zone de 200 µm × 200 µm afin de mieux montrer les cellules à proximité d'un vaisseau.

La distribution des ions inorganiques a aussi été étudiée. Le graphique en Figure 36 montre les aires normalisées des pics du potassium et de la tryptamine. Une forte décroissance de l'intensité des pics du potassium a été constatée à partir de la zone de transition avancée. Ce résultat conforte l'hypothèse précédente que les arbres peuvent recycler les éléments minéraux afin de croître sur dans des sols pauvres en ces éléments. De plus, pour les champignons nécessitant ces nutriments pour croître, le duramen devient moins « intéressant » en s'appauvrissant en inorganique.

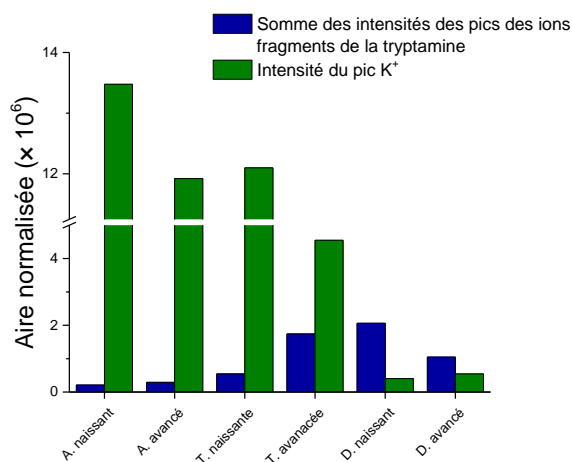


Figure 36 : Aires normalisées de la somme des ions fragments de la tryptamine et du potassium mesurées pour les différentes zones étudiées a) aubier naissant b) aubier avancé c) zone de transition naissante d) zone de transition avancée e) duramen naissant f) duramen avancé.

La somme des images ioniques des ions Ca^+ et CaOH^+ a montré que l'abondance de cet élément inorganique décroît lorsque le bois mûrit, et qu'il est ensuite détecté exclusivement à la jonction entre les cellules à partir de la zone de transition. L'hypothèse envisagée est que la pectine située dans les lamelles mitoyennes chélaterait cet élément empêchant celui-ci d'être recyclé.

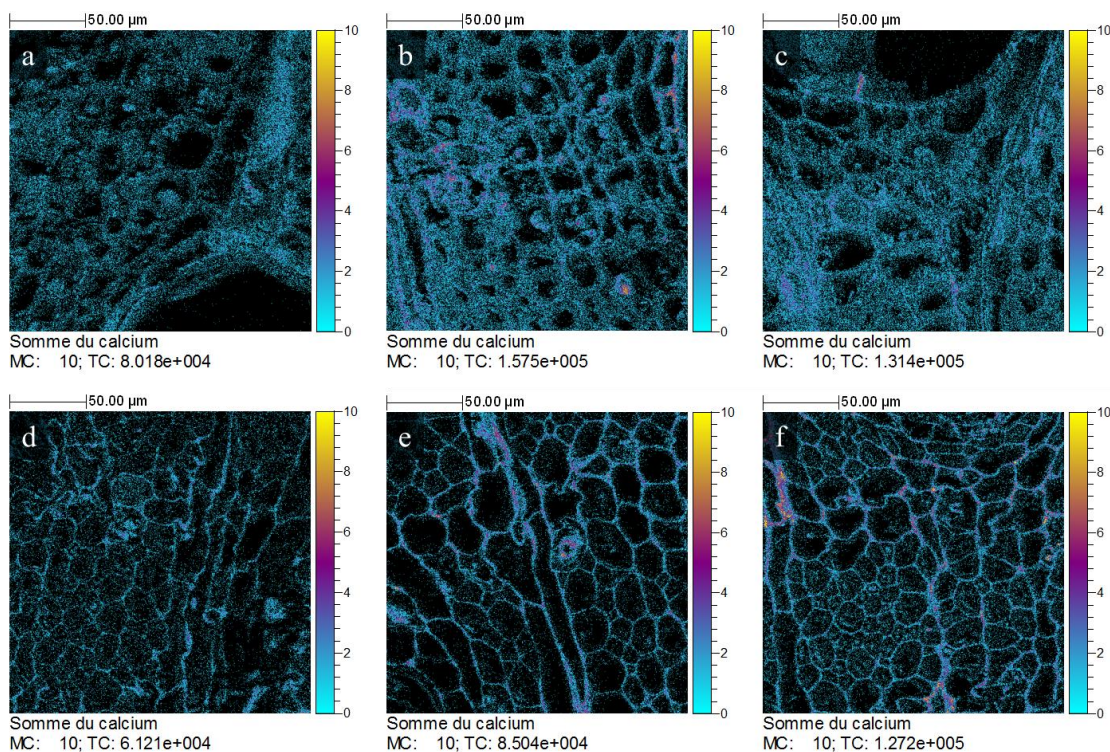


Figure 37 : Distribution des ions du calcium (Ca^+ et CaOH^+) pour les différentes zones étudiées a) aubier naissant b) aubier avancé c) zone de transition naissante d) zone de transition avancée e) duramen naissant f) duramen avancé. Les images ont été rognées pour « zoomer » sur une zone de 200 µm × 200 µm afin de mieux montrer les cellules à proximité d'un vaisseau.

Pour vérifier que le calcium est bien localisé dans la lamelle mitoyenne deux outils ont été utilisés sur les images de l'aubier avancé et du duramen naissant. Le premier est la superposition de trois images ioniques correspondant à la somme des ions fragments des polysaccharides, de la lignine et de la somme des ions du calcium. Le second est la mesure de l'intensité des trois images individuelles le long d'un segment de droite entre deux cellules de parenchyme axial, appelé *line scan* dans le logiciel SurfaceLab 6.5. Le résultat est présenté sur la Figure 38. Les superpositions montrent que le calcium est localisé à la jonction entre les cellules, et cela est confirmé par le *line scan*. La présence du calcium dans la lamelle mitoyenne peut s'expliquer par la présence dans celle-ci de pectine qui chélaterait les ions calcium. Saito *et al.* ont déjà discuté de la possibilité que la pectine chélate les inorganiques, mais toutefois sans pouvoir l'observer par TOF-SIMS, probablement par ce qu'ils ont employé de l'eau dans leur protocole de préparation avant la coupe [38].

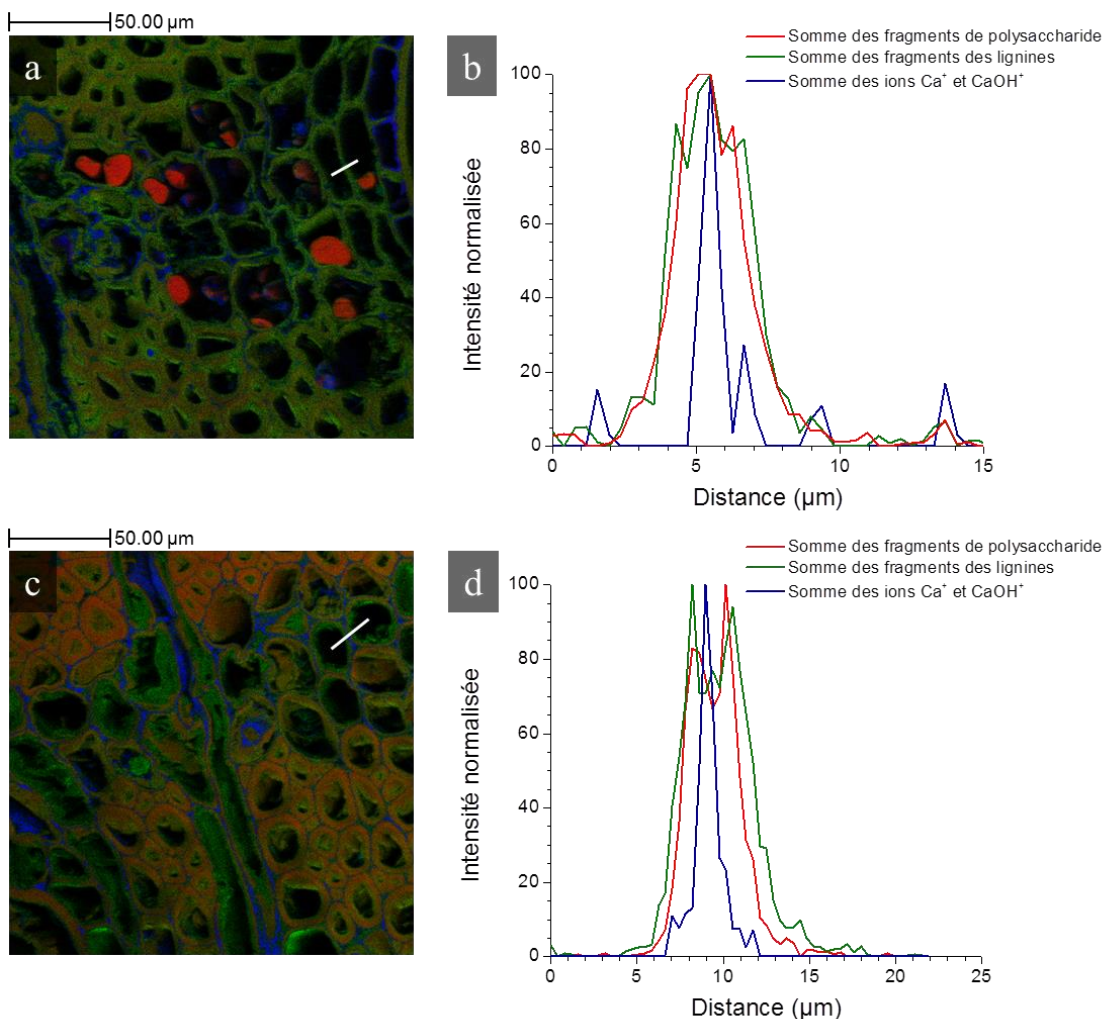


Figure 38 : Superposition trois couleurs de la somme des ions fragments des polysaccharides (rouge), de la somme des ions fragments des lignines (vert), et du calcium (Ca^+ et CaOH^+ , bleu). a) aubier avancé c) duramen naissant. « scan line » effectués le long du segment blanc en a) et c) de la somme des ions fragments des polysaccharides (rouge), de la somme des ions fragments des lignines (vert) et de la somme des ions du calcium (Ca^+ et CaOH^+ , bleu). Les images ont été rognées pour « zoomer » sur une zone de $200\text{ }\mu\text{m} \times 200\text{ }\mu\text{m}$ afin de mieux montrer les cellules à proximité d'un vaisseau.

L'espèce *D. guianensis* est aussi connue pour contenir de la silice. Lors de cette étude, la distribution de la silice au sein des différentes zones anatomiques a donc été aussi étudiée. La Figure 39 montre la distribution des fragments de la silice à travers les différents échantillons. Cette silice est présente sous forme de petites structures détectées dans toutes les zones étudiées.

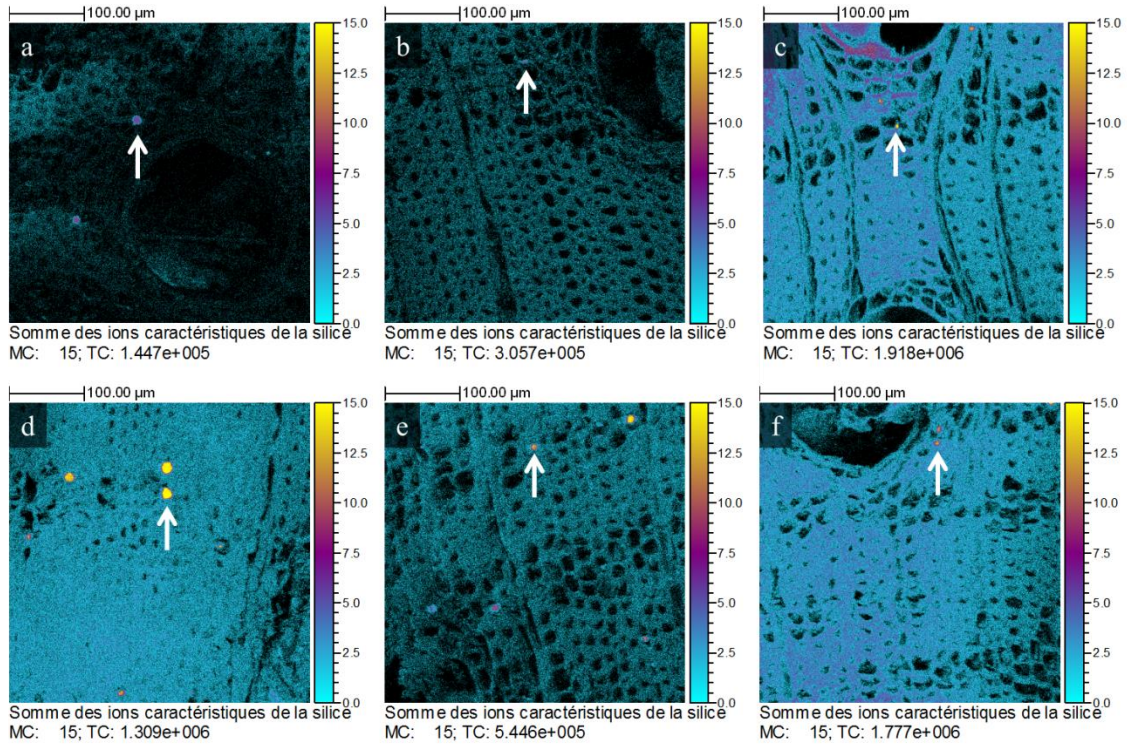


Figure 39 : Distribution des fragments de la silice (en mode négatif) pour les différentes zones étudiées a) aubier naissant b) aubier avancé c) zone de transition naissante d) zone de transition avancée e) duramen naissant f) duramen avancé.

Des régions d'intérêt ont été dessinées sur ces structures : le spectre obtenu est présenté en Figure 40 et montre les ions caractéristiques de la silice qui ont été détectés.

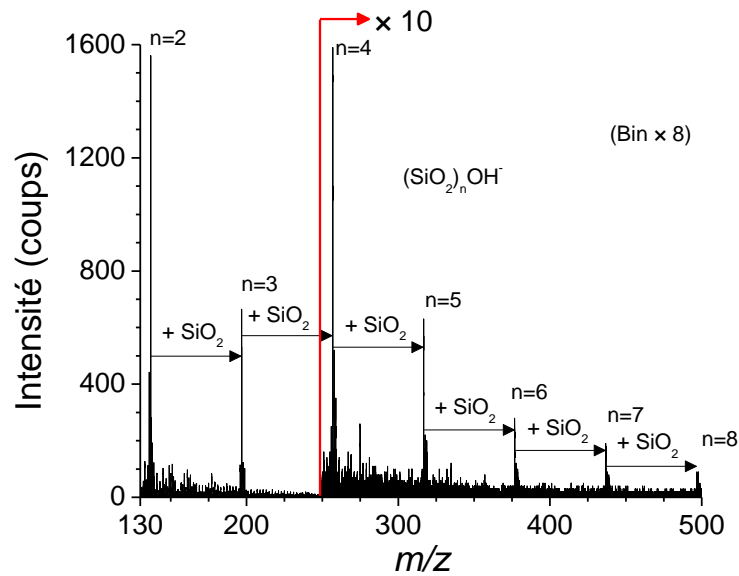


Figure 40 : Spectre de masse en mode négatif de la ROI des structures suspectées d'être de la silice.

Il est envisagé que ces structures de silice servent à l'arbre pour se défendre contre les insectes xylophages. Leur présence permettrait de détériorer les mandibules des insectes xylophages tentant de se nourrir de cette espèce.

IV.1.2. Conclusion et perspectives

Le bois est un matériau complexe et difficile à analyser, mais néanmoins passionnant à étudier. Des surfaces de bois ont été obtenues à l'aide d'un ultra-microtome équipé d'un couteau de diamant. À l'avenir, il peut être envisagé d'employer une sonde ionique focalisée (*focused ion beam* FIB) de bismuth qui permettrait de creuser un cratère dans l'échantillon (*milling*). L'échantillon serait tourné de 90° pour analyser la paroi du cratère avec la même source FIB. Les derniers développements technologiques produits par la société ION-TOF GmbH, permettent d'obtenir un cratère de 20 µm de profondeur et une résolution spatiale inférieure à 50 nm [47].

Dans ce projet, l'imagerie TOF-SIMS a été privilégiée car elle permet d'analyser le bois à une résolution spatiale inférieure au micromètre, permettant ainsi de localiser les ions d'intérêt à l'échelle cellulaire. Pour obtenir une meilleure attribution des ions détectés, la méthode *burst alignment* avec extraction retardée, développée pendant cette thèse a été appliquée. La solution pour résoudre les problèmes d'étalonnage en masse évoqués dans le chapitre précédent a été vérifiée, elle nécessite d'étalonner le spectre avec des ions entourant les gammes de masse étudiées. Cette solution nécessite tout de même de connaître préalablement au moins une partie de la composition de l'échantillon. Il peut être cependant envisagé d'introduire un étalon dans un échantillon pour l'étalonnage. L'imagerie TOF-SIMS est une technique permettant d'étudier simultanément la composition en polymères de structures du bois, les éléments inorganiques et les métabolites secondaires. Trois voies de défense des arbres impliquées dans leur durabilité ont été vérifiées par cette méthode. Ces trois voies sont les suivantes :

- Diminution de la concentration en éléments nécessaires au développement des nuisibles (amidon et inorganiques),
- Production de métabolites toxiques (Tryptamine),
- Production de petites structures de silice.

La diminution en éléments inorganiques a été observée au niveau de la zone de transition avancée, alors que l'amidon est absent dès la zone de transition naissante. La tryptamine apparaît au niveau de la zone de transition naissante mais est franchement exprimée dans les cellules de parenchyme de la zone de transition avancée, puis se diffuse dans la paroi de toutes les cellules. Les structures de silice sont observées dans toutes les zones étudiées.

Les perspectives pour continuer ce travail seraient d'étudier d'autres individus de *D. guianensis* ayant crû sous des contraintes différentes, pour étudier quelles contraintes environnementales permettraient d'induire la duraminisation. Il serait aussi intéressant d'étudier des espèces ayant des durabilités différentes pour comparer si elles favorisent seulement certaines voies de défense ou en créent d'autres. Une autre voie de défense des végétaux employée pour se défendre contre des pathogènes est de former une association endosymbiotique. L'endosymbiose est l'union bénéfique d'un microorganisme et du végétal,

Application de l'imagerie par spectrométrie de masse aux substances naturelles

et l'étude d'une souche endophyte contre le pathogène d'un végétal par imagerie par spectrométrie de masse est l'objet du prochain chapitre.

IV.1.3. Références

- [1] Laberche, J-C. "Biologie végétale - 3ème édition" *Dunod*, **2001**.
- [2] Muschitz, A. "Réponse physiologiques de végétaux supérieurs aux stress métalliques" *Thèse de l'université d'Artois*, **2009**.
- [3] Ruelle, J. "Analyse de la diversité du bois de tension de 3 espèces d'angiospermes de forêt tropicale humide de Guyane Française" *Thèse de l'université Antilles Guyane*, **2006**.
- [4] Shmulsky, R.; Jones, D. P. "Forest Products and Wood Science: An Introduction, Sixth Edition" *John Wiley & Sons, Inc.*, **2011**.
- [5] Parham, R. A.; Gray, R. L. "The chemistry of solid wood" Chapter 1, *American Chemical Society*, **1984**
- [6] Wiedenhoef Alex C. and Miller Regis B. "Wood chemistry and wood composites –Part 1" *CRC Press*, **2005**.
- [7] Callado, C. H.; da Silva Neto, S. J.; Scarano, F. R.; Costa, C. G. "Periodicity of growth rings in some flood-prone trees of the Atlantic Rain Forest in Rio de Janeiro, Brazil" *Trees*, **2001**, *15*, 492-497.
- [8] Sauter, Jörg J.; van Cleve, B. "Storage, mobilization and interrelations of starch, sugars, protein and fat in the ray storage tissue of poplar trees" *Trees*, **1994**, *8*, 297-304.
- [9] IAWA "multilingual glossary of terms used in wood anatomy" Verlagsanstalt Buchdruckerei Konkordia, 186, 1964
- [10] Hillis, W E. "Heartwood and tree exudates" Springer-Verlag, 268, 1987
- [11] Satoshi, N.; Yusuke, Y.; Yuzou, S.; Ryo, Funda. "Temporally and spatially controlled death of parenchyma cells is involved in heartwood formation in pith regions of branches of *Robinia pseudoacacia* var. *inermis*" *Journal of Wood Science*, **2012**, *58*, 69-76.
- [12] Datta, S. K.; Kumar, A. "Histochemical studies of transition from sapwood to heartwood in *Tectona grandis*" *IAWA Bulletin*, **1987**, *8*, 363-368.
- [13] Peters, B. C.; Creffield, J. W.; Eldridge, R. H. "Lyctine (Coleoptera: Bostrichidae) pests of timber in Australia: A literature review and susceptibility testing protocol" *Australian Forestry*, **2002**, *65*, 107-119.
- [14] Carrodus B. B. "Carbone dioxide and the formation of heartwood" *New Phytologist* **1971**, *70*, 939-943.
- [15] Taylor, A. M.; Gartner, B. L.; Morrell, J. J. "Heartwood formation and natural durability – A review" *Wood and Fiber Science*, **2002**, *34*, 587-611.
- [16] Andrews, J. A.; Siccama, T. G.; VogKristiina A. "The effect of soil nutriment availability on retranslocation of Ca, Mg and K from senescing sapwood in Atlantic white cedar" *Plant and Soil*, **1999**, *208*, 117-123.
- [17] Rowell Roger M., Pettersen Roger, Han James S., Rowell Jeffrey S. and Tshabalala Mandla A. "Wood chemistry and wood composites –Part 1 chapter 3" *CRC Press* 2005
- [18] Banoub, J.; Delmas Jr. G-H.; Joly, N.; Mackenzie, G.; Cachet, N.; Benjelloun-Mlayah, B.; Delmas, M. "A critique on the structural analysis of lignins and application of novel tandem mass spectrometric strategies to determine lignin sequencing" *Journal of Mass Spectrometry*, **2015**, *50*, 5-48.
- [19] Daayf Fouad, Lattanzio Vincenzo "Recent Advances in Polyphenol Research, volume 1" Blackwell Publishing Ltd, 2008
- [20] Nieminen, K.; Robischon, M.; Immanen, J.; Ykä, H. "Towards optimizing wood development in bioenergy trees" *New Phytologist*, **2012**, *194*, 46-53.
- [21] Schrader, S.; Sauter, J. J. "Seasonal changes of sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase activities in poplar wood (*Populus X canadenses* Moench <robusta>) and their possible role in carbohydrate metabolism" *Journal of Plant Physiology*, **2002**, *159*, 833-843.
- [22] Ridley, B. L.; O'Neill, M. A.; Mohnen, D. "Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling" *Phytochemistry*, **2001**, *57*, 929-967.
- [23] Ucar, M. B.; Ucar, G. "Characterization of methanol extracts from *Quercus hartwissiana* wood and bark" *Chemistry of Natural Compounds*, **2011**, *47*, 697-703.
- [24] Hovelstad, H.; Leirset, I.; Oyass, K.; Fiksgahl, A. " Screening analyses of pinosylvin stilbenes, resin acids and lignans in Norwegian conifers" *Molecules*, **2006**, *11*, 103-114.
- [25] Kanami, M-Y.; Ryoko, I.; Hiroyuki, F.; Takashi, O.; Yutaka, A.; Takenori, K.; Motoyoshi, S.; Setsuko, S.; "Leishmanicidal activities and cytotoxicities of bisnaphthoquinone analogues and naphthol derivatives from Burman *Diospyros burmanica*" *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2012**, *20*, 5215-5219.
- [26] Vivas, N.; Nonier, M-F.; Pianet, Isabelle.; Vivas de Gaulejac, N.; Fouquet, E. "Proanthocyanidins from *Quercus petrae* and *Q. robur* heartwood : quantification and structures" *Compte Rendus. Chimie*, **2006**, *9*, 120-126.
- [27] Himajima, M.; Hobson, K. R.; Otsuka, T.; Wood, D. L.; Kubo, Isao. "Antimicrobial terpenes from oleoresin of ponderosa pine tree *Pinus ponderosa* a defense mechanism against microbial invasion" *Journal of chemical ecology*, **1992**, *18*, 1809-1818.

-
- [28] Rodrigues, A. M. S.; Amusant, N.; Beauchêne, J.; Eparvier, V.; Leménager, N.; Baudassé, C.; Espindola, L. S.; Stien, D.; "The termicidal activity of *Sextonia rubre* (Mez) van der Werff (Lauraceae) extract and its active constituent rubrynnolide" *Pest Management Science*, **2011**, 67, 1420-1423.
- [29] Saito, K.; Kato, T.; Tsuji, Y.; Fukushima, K. "Identifying the Characteristic Secondary Ions of Lignin Polymer Using ToF-SIMS" *Biomacromolecules*, **2005**, 6, 678-683.
- [30] Imai, T.; Tanabe, K.; Kato, T.; Fukushima, K. "Localization of ferruginol, a diterpene phenol, in *Cryptomeria japonica* heartwood by time-of-flight secondary ion mass spectrometry" *Planta*, **2005**, 221, 549-556.
- [31] Tokareva, E. N.; Fardim, P.; Pranovich, A. V.; Fagerholm, H.-P.; Daniel, G.; Holmbom, B. "Imaging of wood tissue by ToF-SIMS: Critical evaluation and development of sample preparation techniques" *Applied Surface Science*, **2007**, 253, 7569-7577.
- [32] Saito, K.; Mitsutani, T.; Imai, T.; Matsushita, Y.; Fukushima, K. "Discriminating the Indistinguishable Sapwood from Heartwood in Discolored Ancient Wood by Direct Molecular Mapping of Specific Extractives Using Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry" *Analytical Chemistry*, **2008**, 80, 1552-1557.
- [33] Saito, K.; Mitsutani, T.; Imai, T.; Matsushita, Y.; Yamamoto, A.; Fukushima, K. "Chemical differences between sapwood and heartwood of *Chamaecyparis obtuse* detected by ToF-SIMS" *Applied Surface Science*, **2008**, 255, 1088-1091.
- [34] Goacher, R. E.; Jeremic, D.; Master, E. R. "Expanding the library of Secondary Ions That Distinguish Lignin and Polysaccharides in Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Analysis of Wood" *Analytical Chemistry*, **2011**, 83, 804-812.
- [35] Zhou, C.; Li, Q.; Chiang, V. L.; Lucia, L. A.; Griffis, D. P. "Chemical and Spatial Differentiation of Syringyl and Guaiacyl Lignins in Poplar Wood via Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry" *Analytical Chemistry*, **2011**, 83, 7020-7026.
- [36] Jung, S.; Foston, M.; Kalluri, U. C.; Tuskan, G. A.; Ragauskas, A. J. "3D Chemical Image using TOF-SIMS Revealing the Biopolymer Component Spatial and Lateral Distributions in Biomass" *Angewandte Chemie, International Edition*, **2012**, 51, 12005-12008.
- [37] Kuroda, K.; Fujiwara, T.; Imai, T.; Takama, R.; Saito, K.; Matsushita, Y.; Fukushima, K. "The cryo-TOF-SIMS/SEM system for the analysis of the chemical distribution in freeze-fixed *Cryptomeria japonica* wood" *Surface and Interface Analysis*, **2013**, 45, 215-219.
- [38] Saito, K.; Watanabe, Y.; Matsushita, Y.; Imai, T.; Koike, T.; Sano, Y.; Funada, R.; Fukazawa, K.; Fukushima, K. "Aluminum localization in the cell walls of the mature xylem of maple tree detected by elemental imaging using time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS)" *Holzforschung*, **2014**, 68, 85-92.
- [39] Hammond, D.S.; Gourlet-Fleury, S.; van der Hout, P.; ter Steege, H.; Brown, V. K. "A compilation of known Guianan timber trees and the significance of their dispersal mode, seed size and taxonomic affinity to tropical rain forest management" *Forest Ecology and Management*, **1996**, 83, 99-116.
- [40] Bereau, M.; Barigah, T. S.; Louisanna, E.; Garbaye, J. "Effects of endomycorrhizal development and light regimes on the growth of *Dicorynia guianensis* Amshoff seedlings" *Annals of Forest Science*, **2000**, 57, 725-733.
- [41] Kukachka, B. F. "Properties of Imported Tropical Woods" *Conference on Tropical Ward Wood*, **18-21 August 1969**, Syracuse University. Madison, WI, USA: Forest Product Laboratory, Forest Service, U.S. Departement of Agriculture.
- [42] Anouhe, J-B. S.; Adima, A. A.; Niamké, F. B.; Stien, D.; Amian, B. K.; Blandinières, P-A.; Virieux, D.; Pirat, J-L.; Kati-Coulibaly, S.; Amusant, N. "Dicorynamine and harmalan-N-oxide, the new β -carboline alkaloids from *Dicorynia guianensis* Amsh heartwood" *Phytochemistry Letters*, **2015**, 12, 158-163.
- [43] Stien, D.; Amusant, N. "communication personnelle"
- [44] Seyer, A.; Einhorn, J.; Brunelle, A.; Laprévote, O. "Localization of Flavonoids in seeds by Cluster Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Imaging" *Analytical Chemistry*, **2010**, 82, 2326-2333.
- [45] P. Richardin, V. Mazel, P. Walter, O. Laprévote, A. Brunelle. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2011**, 22, 1729-1736.
- [46] Baldwin, P. M.; Melia, C. D.; Davies, M. C. "The surface chemistry of starch granules studied by Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry" *Journal of Cereal Science*, **1997**, 26, 329-346.
- [47] Kollmer, F.; Wolfgang P.; Krehl, M.; Niehuis, E. "Ultra high spatial resolution SIMS with cluster ions – approaching the physical limits" *Surface and Interface Analysis*, **2013**, 45, 312-314.

Chapitre V

**Application de l'imagerie par spectrométrie de masse aux
substances naturelles 2^{ème} partie : Imagerie par
spectrométrie de masse de micro-organismes**

V. Application de l'imagerie par spectrométrie de masse aux substances naturelles 2^{ème} partie : Imagerie par spectrométrie de masse de micro-organismes

V.1. État de l'art

En plus du projet initial portant sur la méthodologie pour combiner en imagerie TOF-SIMS une bonne résolution en masse et spatiale et sur l'étude de la duraminisation de *Dicorynia guianensis*, des collaborations ont été initiées. Dans cette partie, est discuté le projet d'imagerie par spectrométrie de masse de la communication chimique entre deux souches endophytes extraites d'un même végétal. Avant d'introduire plus en détail ce projet d'imagerie, un bref état de l'art sur les applications de l'imagerie par spectrométrie de masse en microbiologie est présenté.

L'imagerie par spectrométrie de masse a été appliquée à l'analyse de micro-organismes. Historiquement, pour montrer les capacités de l'imagerie TOF-SIMS et son intérêt en biologie, des expériences ont été faites pour étudier la distribution intracellulaire d'ions inorganiques de cellules animales [1]. Ensuite, la distribution de molécules organiques au sein de cellules d'un protozoaire appelé *Paramecium multimicronucleatum* a été montrée par Colliver *et al.* [2]. Pour cela, la technique de *freeze-fracture* a été mise au point et adaptée pour conserver la structure des membranes cellulaires de ce micro-organisme.

Mais l'imagerie de cellules uniques en TOF-SIMS n'a pas été uniquement destinée à des études méthodologiques. Par exemple, l'assimilation de carbone et d'azote par des bactéries a été l'objet d'un article, la Figure 1a et b montre la distribution « des » ions « $^{26}\text{CN}^-$ » et « $^{27}\text{CN}^-$ » (marqués en azote 15) sur un échantillon bactérien et la Figure 1c montre la même distribution sur un hyphe fongique à proximité d'une bactérie [3]. Cela a montré la possibilité d'utiliser la technique TOF-SIMS pour étudier l'assimilation en azote d'un micro-organisme.

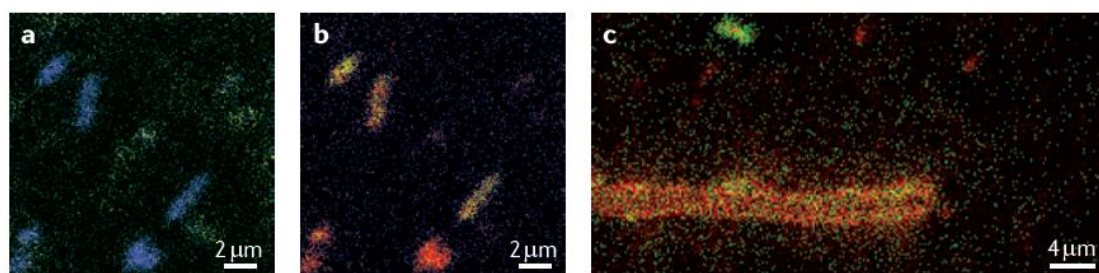


Figure 1 : Image ionique d'éléments marqués provenant de l'empreinte d'un échantillon de terre permettant l'image de cellule unique. a) Distribution spatiale des ions SiO_2^- en jaune et de la somme de $^{26}\text{CN}^-$ et $^{27}\text{CN}^-$ en bleu sur un échantillon bactérien b) Distribution spatiale des ions $^{26}\text{CN}^-$ en rouge et $^{27}\text{CN}^-$ en vert sur un échantillon bactérien c) Distribution spatiale des ions $^{26}\text{CN}^-$ en rouge et $^{27}\text{CN}^-$ en vert d'un champignon. D'après la référence 3.

En 2004, une étude sur la distribution hétérogène des lipides membranaires lors de la fusion de deux cellules de *Tetrahymena thermophila* a été effectuée à l'aide de la technique TOF-SIMS [4]. Cela a permis de montrer que *T. thermophila* est capable de modifier une

partie de sa membrane cellulaire avant de procéder à un échange de plasmide pour une reproduction sexuée.

La technique nano-SIMS permet quant à elle d'obtenir la distribution spatiale d'isotopes avec une très bonne résolution [5]. La distribution élémentaire de spores de *Bacillus thuringiensis israelensis*, un analogue asymptotique de *Bacillus anthracis* a été explorée par nano-SIMS [6]. En plus de cette application en sciences légales, le nano-SIMS a été utilisé pour étudier la distribution des métaux (Figure 2) au sein de cellules de chlorelles d'eau douce pour des études environnementales [7].

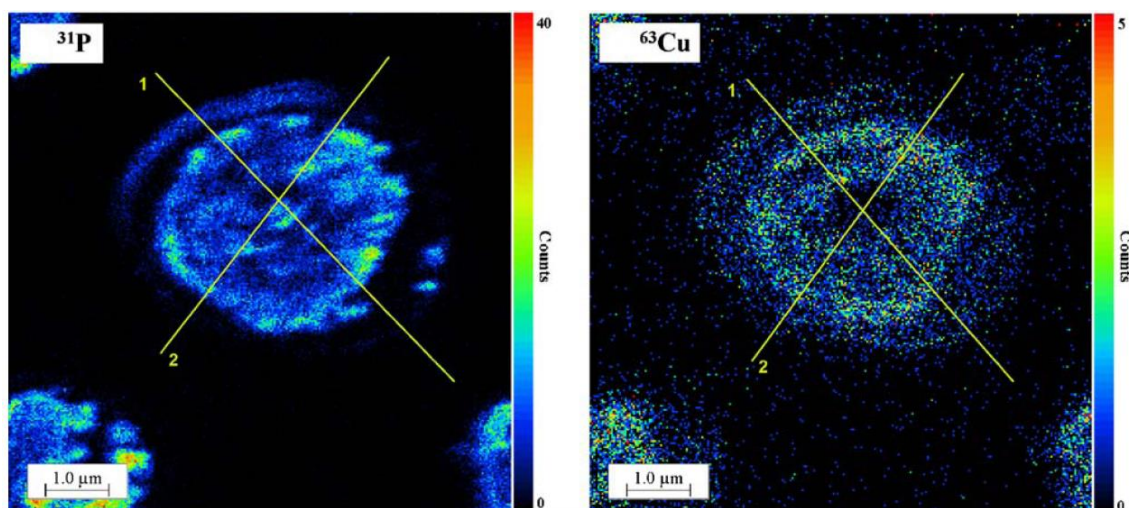


Figure 2 : Distribution de ^{31}P et de ^{63}Cu au sein d'une cellule de *Chlorella kesslerii*. D'après la référence 7.

L'utilisation de l'imagerie par spectrométrie de masse ne s'est pas limitée à l'analyse de cellules uniques. Des communautés microbiennes ont été analysées avec différents instruments. Par exemple, des mattes microbiennes ont été étudiées avec un TOF-SIMS à plusieurs reprises par l'équipe de Peter Sjövall [8,9,10]. En 2008, Debois *et al.* publient un article sur l'étude de la distribution des surfactines à la surface d'un biofilm transféré sur une plaque de silicium par imagerie TOF-SIMS [11]. Dans cette étude, il avait été montré que plus la chaîne acyle de la surfactine est petite, plus celle-ci est détectée proche de la colonie mère. Au contraire les surfactines ayant une chaîne acyle plus longue sont localisées plus loin de la colonie mère. Cela a permis de mieux comprendre comment les surfactines sont impliquées dans le phénomène de *swarming* des biofilms de *Bacillus subtilis*. La Figure 3 montre la distribution de la somme des surfactines détectées sur une empreinte d'une colonie. Dans la thèse du premier auteur de cet article, des informations complémentaires sont disponibles. Une comparaison avait été effectuée sur des acquisitions obtenues avec et sans utilisation du canon à électrons. Une forte diminution de l'intensité des surfactines avait été mesurée lorsque ce canon à électrons était employé [12]. Ceci est lié à l'endommagement des molécules de surfactine par le flux d'électrons, comme il a été décrit en II.1.2.d. L'échantillon étant une empreinte d'une colonie microbienne sur une plaque de silicium, la surface de celui-ci était conductrice, et l'utilisation du canon à électron n'était pas nécessaire dans ce cas.

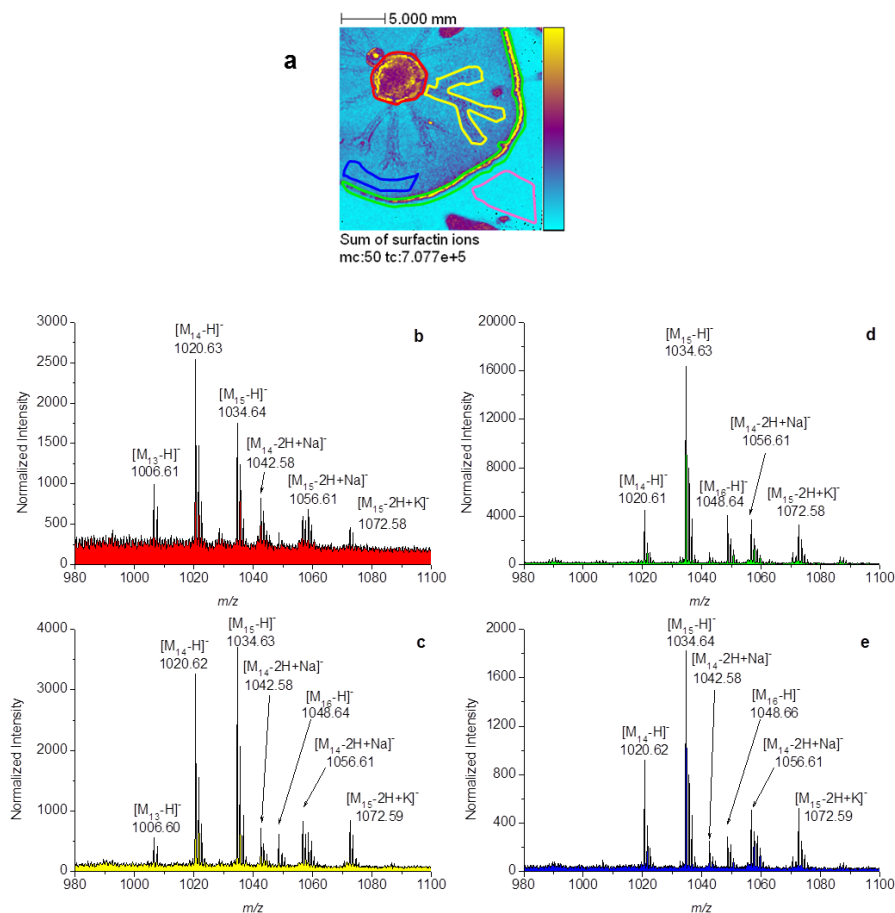


Figure 3 : Répartition des différentes espèces de surfactines à la surface du swarming. a : Image ionique de la somme des ions de surfactines, avec des régions d'intérêt (ROI) délimitées par les contours de couleurs rouge, jaune, verte et bleue. mc représente l'intensité maximale dans l'image, et tc le nombre total de coups. L'échelle de couleur correspond à l'intervalle [0, MC]. b,c,d,e : Spectres de masse partiels obtenus à partir des ROI b : colonie mère (rouge), c : Dendrite (jaune), d : anneau (vert), e : au-delà de la pointe des dendrites (bleu). La ROI délimitée par la zone en magenta ne contenait aucune surfactine détectable [11].

Mais les techniques d'imagerie basées sur la spectrométrie de masse d'ions secondaires n'ont pas été les seules à être employées dans des études de microbiologie. En 2009, l'équipe de Dorrestein publie son premier article sur l'imagerie MALDI-TOF de souches ayant crû en compétition sur des gels d'agarose [13]. En inoculant et incubant *Streptomyces coelicolor* et différents mutants de *Bacillus subtilis*, la production de surfactines et de plipastatines a été mise en évidence pour les souches *wild type* de *B. subtilis*. Des ions correspondant aux molécules protonées de CDA (*Calcium Dependant Antibiotic*) et de SapB ont été détectés dans la colonie de *S. coelicolor*. Mais ces composés ne sont exprimés que si *S. coelicolor* est en présence d'une souche mutante de *B. subtilis* n'exprimant pas de surfactines (Figure 4). Il a alors été établi que la production de métabolites nécessaire à la défense de *S. coelicolor* est inhibée en présence de surfactines. Cette méthode permettant d'étudier les métabolites exprimés par une souche ou entre deux souches a été reprise et est l'objet de nombreuses publications [14,15,16,17,18,19,20].

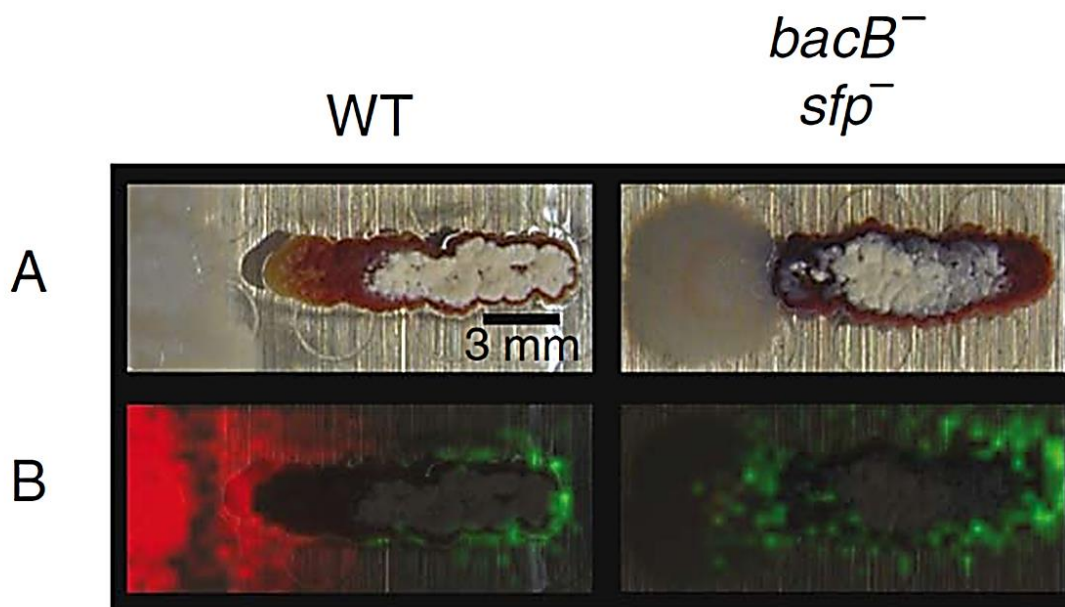


Figure 4 : A) Image optique de la compétition entre *B. subtilis* (souche à gauche) et *S. coelicolor* (souche à droite). B) Superposition de deux cartes de densité ionique, en rouge la somme des ions caractéristiques de la surfactine, en vert la molécule protonée de SapB. WT = Wild Type, et *bacB*⁻ *sfp*⁻ est une souche mutante n'exprimant pas de bacillaène, de surfactines ni de plipastatines. D'après la référence 13.

En 2013, Watrous *et al.* ont mis au point une méthode pour obtenir un modèle 3D de la distribution des métabolites impliqués dans des compétitions microbiennes à l'aide de l'imagerie MALDI [21]. Le protocole utilisé est schématisé dans la Figure 5. Dans cette étude, la gélose a été coupée perpendiculairement à la surface de la compétition. Les surfaces des sections ont été analysées individuellement. Puis les données ont été exportées et retraitées avec le logiciel MATLAB où un algorithme a permis de projeter un modèle en 3D de la distribution de chaque ion détecté. Cette méthode a donné la distribution en trois dimensions des molécules exprimées dans une compétition microbienne et a permis de détecter des molécules étant exprimées dans la profondeur du milieu de culture. De plus, certaines colonies microbiennes développent des structures en profondeur.

Aujourd'hui, les techniques d'ionisation à pression atmosphérique sont appréciées car elles peuvent simplifier la préparation d'échantillon et ne nécessitent pas de déshydratation de la gélose. La technique DESI pour *desorption electrospray ionisation* a permis d'observer les échanges entre *B. subtilis* et *S. coelicolor* [22]. Cependant à cause des propriétés absorbantes de la gélose et sa capacité à se déformer facilement, c'est une empreinte de la culture qui a été analysée par cette technique. Le nanoDESI qui emploie une pression de gaz de nébulisation moins importante que la source DESI, a été utilisé pour analyser des compétitions microbiennes ne nécessitant aucune préparation d'échantillon avant analyse [23]. L'équipe de Zoltan Takats a développé une autre technique d'ionisation à pression atmosphérique basée sur l'ionisation par effet Joule [24]. Ce système appelé REIMS pour *Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry* a été utilisé pour étudier une surface sur laquelle trois souches ont crû en compétition. Cela a permis de détecter spatialement la distribution de molécules exprimées par les trois souches après une discrimination par analyse multivariée [25].

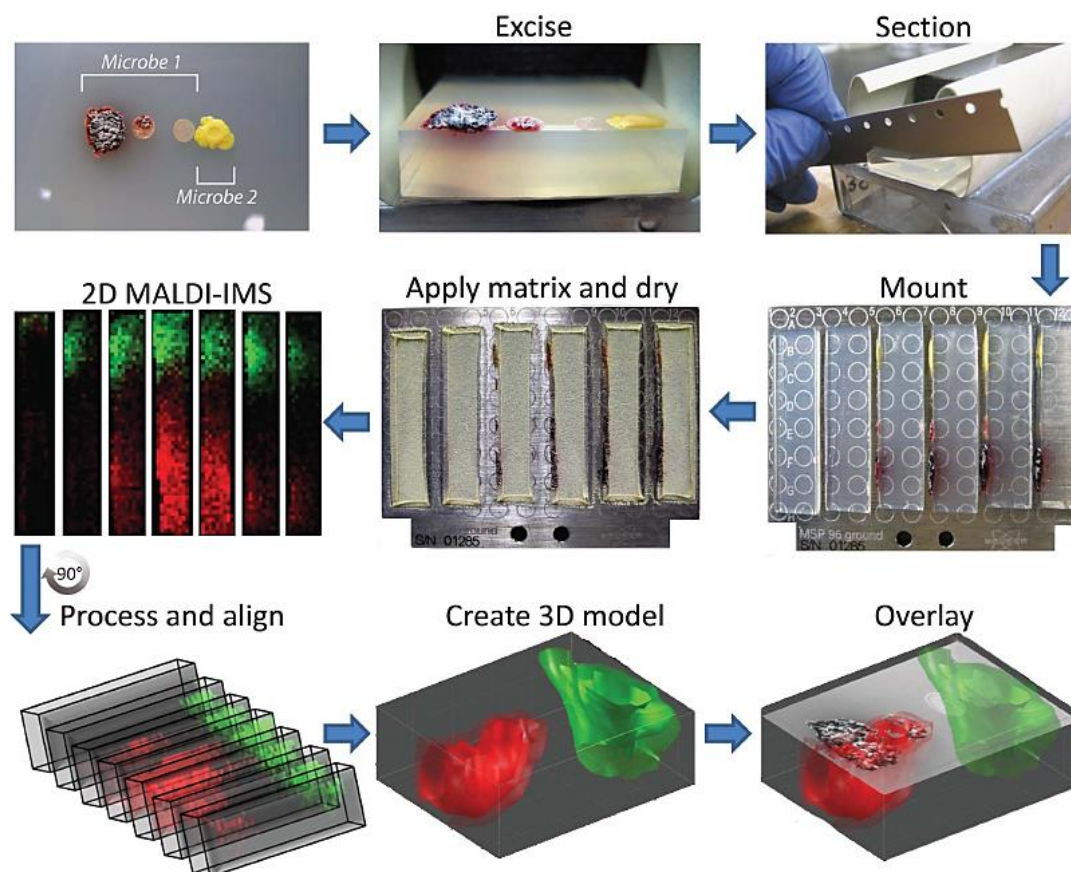


Figure 5 : Schéma du protocole proposé pour l'imagerie trois dimensions de compétitions microbiennes. D'après la référence 21.

Cette application de l'imagerie par spectrométrie de masse à la détection des molécules impliquées dans une compétition entre deux souches a suscité l'intérêt de nos collaborateurs. Ces derniers, experts des associations micro-organismes/plante, sont intéressés par l'apport des outils d'imagerie par spectrométrie de masse pour définir un modèle *in vitro* qui pourrait être un aperçu de ce qui se passe *in planta*. Avant de présenter la problématique plus en détail, une définition et une description des endophytes est présentée dans la partie suivante.

V.1. Les endophytes

V.1.1. Définition

Un endophyte est un micro-organisme vivant au sein d'une plante hôte qui est généralement asymptomatique pour celle-ci. Ces associations sont mutualistes, les micro-organismes permettent par exemple de défendre la plante contre des pathogènes en échange de nutriments et d'un espace pour leur développement [26]. L'étude de fossiles a montré que des associations de champignon et d'embryophyte dataient d'au moins 400 millions d'années, ce qui montre l'importance et le rôle des endophytes dans l'évolution des plantes [27]. Les microorganismes endophytes sont variés, mais sont principalement des bactéries ou des champignons. Dans cette étude, c'est un champignon endophyte qui a été extrait, c'est pourquoi les autres endophytes comme les bactéries ne seront pas décrits par la suite.

Les endophytes fongiques sont distingués dans quatre classes différentes. Initialement, ce sont les champignons de la famille des Clavicipitaceae présents dans des monocotylédones qui ont été les premiers à être étudiés. En effet, ces micro-organismes étant pathogènes ils ont été largement étudiés pour leur impact en agriculture. En 1988, Clay a observé que plus la plante était infectée par le champignon, plus elle devenait résistante et fertile [28]. Il a alors été admis que ces associations étaient basées sur un échange mutualiste. Les endophytes de la famille des Clavicipitaceae représentent la première classe d'endophytes. Généralement, les autres endophytes sont asymptomatiques. Ceux-ci ont suscité un intérêt dès lors que des traces de paclitaxel ont été détectées dans le champignon *Taxomyces andreanae* isolé de l'if de l'Ouest *Taxus brevifolia* [29]. Les champignons endophytes non-Clavicipitaceae sont distingués en trois classes différentes basées sur leur modèle de colonisation de l'hôte, le mécanisme de transmission, le niveau de biodiversité *in planta* et leur fonction écologique [30].

V.1.1. Endophytes extraits de *Cephalotaxus harringtonia*

Récemment, le champignon *Paraconiothyrium variable* a été isolé d'un conifère, un if japonais appelé *Cephalotaxus harringtonia*. Cette souche fongique a montré des propriétés antagonistes contre un pathogène de ce conifère qui est la bactérie *Bacillus subtilis*. Afin d'identifier les métabolites impliqués dans la communication chimique entre *P. variable* et *B. subtilis*, l'imagerie par spectrométrie de masse s'avère être une technique complémentaire aux études métabolomiques qui se font habituellement *via* des méthodes séparatives comme par exemple en LC-MS/MS pour *Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*. L'équipe de Chimie des Produits Naturels Fongiques (CPNF) a notamment isolé et caractérisé deux molécules exprimées par le champignon lorsque les souches sont en compétition. Les structures de ces molécules sont présentées en Figure 6. Ces molécules sont des acides tétroniques et l'équipe CPNF a mesuré une activité inhibitrice de celles-ci sur la croissance de la bactérie.

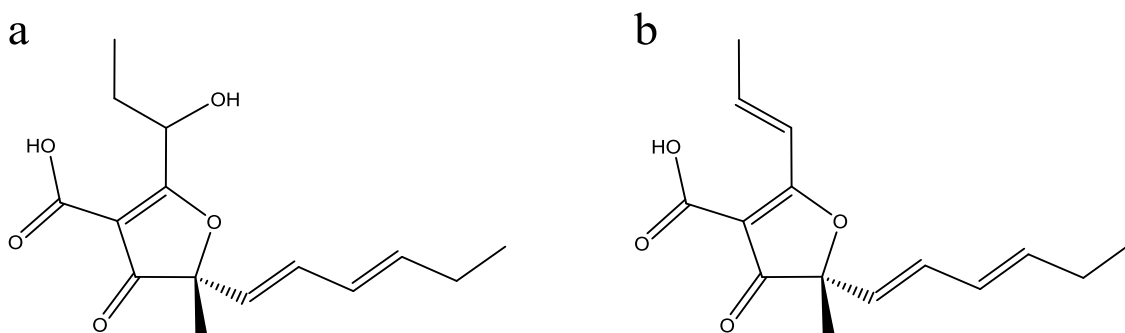


Figure 6 : Structure des deux composés extraits de *P. variable* a) $C_{15}H_{20}O_5$ b) $C_{15}H_{18}O_4$.

La bactérie *B. subtilis* est aussi connue pour produire des cyclo-peptides notamment les surfactines (Figure 7). Ce travail étudiera aussi la distribution spatiale de ces molécules.

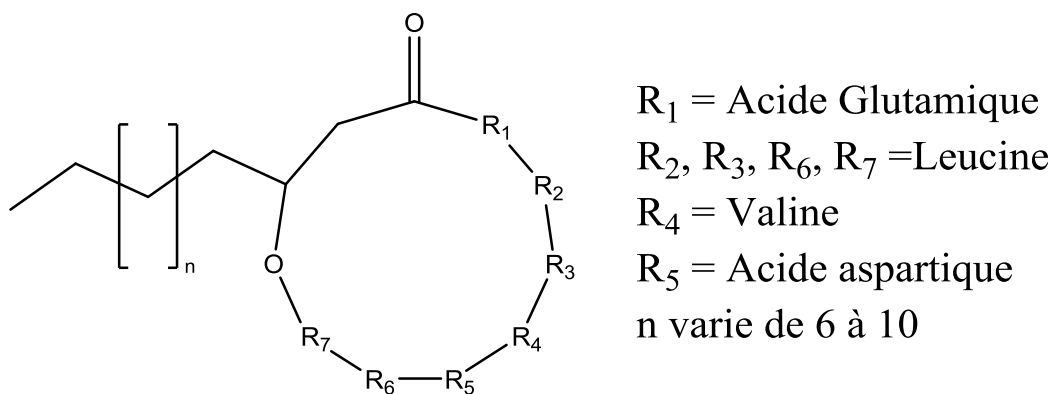


Figure 7: Formule générale des surfactines.

V.2. Méthodologie

À l'ICSN, l'emploi conjoint du TOF-SIMS et du MALDI-TOF dans la même étude a déjà été mis en œuvre pour combiner la haute résolution spatiale du TOF-SIMS et la haute sensibilité et haute résolution en masse du MALDI-TOF dans le cadre de l'analyse de tissus animaux [31]. Dans le cadre de ce projet, l'objectif est de combiner ces deux techniques afin de pouvoir détecter la distribution spatiale de molécules ayant des tailles différentes. Les parties suivantes traitent du travail méthodologique pour la préparation des échantillons destinés à l'imagerie MALDI-TOF et TOF-SIMS ainsi qu'à l'analyse des molécules isolées au Museum National d'Histoire Naturelle.

V.2.1. Préparation d'échantillon pour l'imagerie MALDI-TOF de compétitions microbiennes

En 2012, trois méthodes de préparation d'échantillon pour l'imagerie MALDI-TOF de colonie microbienne ont été décrites dans une revue de Yang et al [32].

- La première consiste à déposer le milieu de culture sur la plaque MALDI avant inoculation et incubation (méthode de dépôt direct).
- La seconde méthode consiste à déposer la plaque MALDI dans une boîte de Petri, puis à verser le milieu de culture dans toute la boîte de Petri. (méthode de dépôt indirect).
- Dans la dernière méthode, le milieu est versé dans une boîte de Petri et la culture est transférée *a posteriori* sur la plaque MALDI. (méthode de transfert de gélose).

Pour cette étude, les méthodes de dépôt direct et du transfert de gélose ont été comparées. De plus, une autre méthode a été proposée. Cette nouvelle méthode consiste à verser de la gélose dans une boîte de Petri, puis un morceau de papier filtre est déposé sur le milieu de culture avant inoculation (méthode de transfert de papier filtre). Ainsi les souches poussent directement sur le papier et sont facilement manipulables. Par défaut de temps, la méthode de dépôt indirect n'a pas été essayée.

La Figure 8 montre les images prises au microscope optique des échantillons obtenus avec les méthodes de dépôt direct sur la plaque MALDI (a), de transfert de gélose (b) et du

transfert de papier filtre (c). On peut remarquer que l'échantillon de transfert de gélose présente plus de défauts. En effet il n'a pas été facile de transférer la gélose sur la plaque MALDI, car après dessiccation de la gélose sous vide ou passage à l'étuve celle-ci se déforme et perd son adhésion sur la plaque MALDI. L'astuce a été de sécher à l'étuve le morceau de gélose à transférer à 60 °C pendant 30 minutes puis de le coller sur la plaque MALDI à l'aide de ruban adhésif double face conducteur 3M Core Series 2-0300.

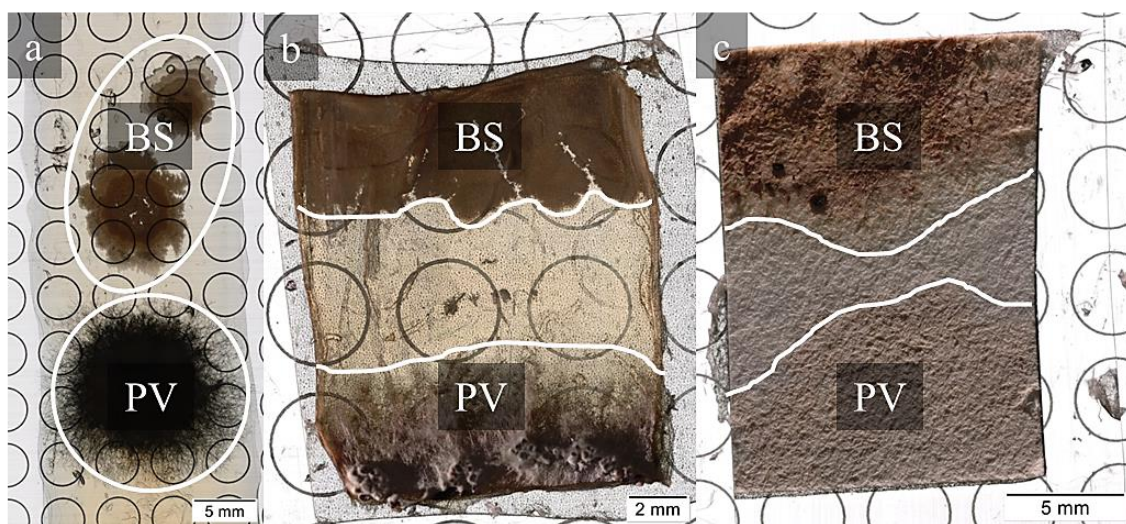


Figure 8 : Images optiques des trois échantillons selon les préparations (a) méthode de dépôt direct (b) méthode de transfert de gélose (c) méthode transfert de papier filtre. L'abréviation BS correspond à *B. subtilis* et PV à *P. variable*, la distance entre les souches correspond à la zone de compétition.

C'est un extrait de malt qui a été utilisé comme milieu de culture. Une quantité de 20 g d'extrait de malt, 20 g de glucose, 1 g de peptone et 20 g d'agar a été ajoutée à un litre d'eau pour préparer le milieu de culture. Celui-ci est resté inchangé tout le long des expériences.

Pour le dépôt de matrice, certaines équipes favorisent l'utilisation d'un tamis moléculaire [13], d'autres le système de vaporisation vibrationnelle ImagePrep [33]. Dans cette étude, le matériel à disposition est un pulvérisateur de matrice TM-SprayerTM (HTX Technologies, Carrboro, NC, USA) qui s'était révélé être un appareil fiable permettant de faire des dépôts de matrice homogènes et reproductibles [34]. Pour les trois échantillons, la procédure de dépôt de matrice est la même. Une solution de matrice CHCA a été dissoute dans un mélange d'acétonitrile/H₂O/acide trifluoroacétique (70/30/0,1 v:v:v) à une concentration de 10 mg·mL⁻¹, puis déposée en employant le TM-Sprayer. La température du spray a été fixée à 70 °C, sa vitesse de déplacement à 120 cm·min⁻¹, la pression du gaz de nébulisation (azote) à 10 psi (*pound-force per square inch*) (~700 hPa) et le débit de la pompe à 0,24 mL·min⁻¹. Après dépôt de la matrice, il a été constaté que l'échantillon obtenu par transfert de papier filtre était recouvert d'une couche de matrice amorphe. L'hypothèse est que le papier filtre absorbe le solvant avant que la matrice ait le temps de cristalliser. Il a aussi été constaté qu'un « effet de matrice » induisait aussi une très faible émission ionique. Cela peut s'expliquer par la présence de cellulose qui supprimera l'émission des ions ou par une mauvaise cristallisation/déposition de la matrice (données non montrées).

Un spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme™ (Bruker Daltonique, Wissembourg, France) a été utilisé pour effectuer les expériences d'imagerie par spectrométrie de masse. Cet instrument est équipé d'un laser de technologie Smartbeam-II™ ND:YAG (longueur d'onde 355 nm), la fréquence du laser a été fixée à 2 kHz et son intensité à 22 % (valeur obtenue après avoir optimisé la valeur du rapport signal/bruit). Le nombre de tirs par pixel a été fixé à 500 et la taille des pixels à 100 µm. Les ions sont extraits après une extraction retardée de 210 ns et accélérés sous une différence de potentiel de 25 kV. L'analyseur a été réglé en mode réflectron. Ce paramétrage a permis de mesurer une résolution en masse à mi-hauteur des pics (FWHM) de 26 000 sur le pic mono-isotopique correspondant à la bradykinine protonée à m/z 1060,57. L'étalonnage a été effectué en externe sur 4 pics du mélange commercial PepMix 5 (LaserBio Labs, Sophia Antipolis, France) (Bradykinine [1-5], m/z 573,31 ; Bradykinine [1-7], m/z 757,40 ; Bradykinine, m/z 1060,57 ; Angiotensine m/z 1296,68) avec l'algorithme « Quadratic » ; une précision en masse moyenne de 3,8 ppm a été mesurée sur ces étalons. Les acquisitions et le retraitement des images (cartes de densité ionique) ont été faits par le logiciel FlexImaging v4.0 (Bruker Daltonique, Wissembourg, France). Les spectres constituant l'image ont été normalisés selon la méthode « médiane » afin d'éviter des artefacts de normalisation comme il a été recommandé par Deininger *et al.* [35].

Les spectres de masse et les images ioniques provenant de l'analyse des échantillons obtenus après les préparations dépôt direct et transfert de la gélose ont été comparés (Figure 9). Deux régions d'intérêts (ROI) ont été dessinées sur chaque image, l'une dans la colonie mère de *B. subtilis*, l'autre en dehors de la colonie bactérienne soit la zone de compétition. La Figure 9a montre un agrandissement des spectres de masse des deux ROI provenant des échantillons obtenus par dépôt direct et la Figure 9b montre le même agrandissement pour les spectres des deux ROI de l'échantillon obtenu après transfert de la gélose. La comparaison permet de mesurer un déplacement en masse de 0,03 Da sur le pic d'un ion d'une surfactine cationisée par le sodium de formule $[C_{53}H_{93}N_7O_{13}+Na]^+$ sur l'échantillon « méthode de dépôt direct » et de 0,3 Da sur l'échantillon « méthode de transfert de la gélose ». En intégrant un pic qui a en général une largeur à mi-hauteur de 0,05 Da, la carte de densité ionique reconstruite sur l'échantillon « méthode de transfert de la gélose » n'est pas correcte, c'est pourquoi l'image a été reconstruite en intégrant sur 0,5 Da. Plus sensible, avec un moindre shift en masse et avec une meilleure résolution en masse mesurée à mi-hauteur des pics (18 000 pour la méthode de dépôt direct contre 12 000 pour celle du transfert de la gélose), la préparation d'échantillon suivant la méthode de dépôt direct a été retenue pour la suite des expériences.

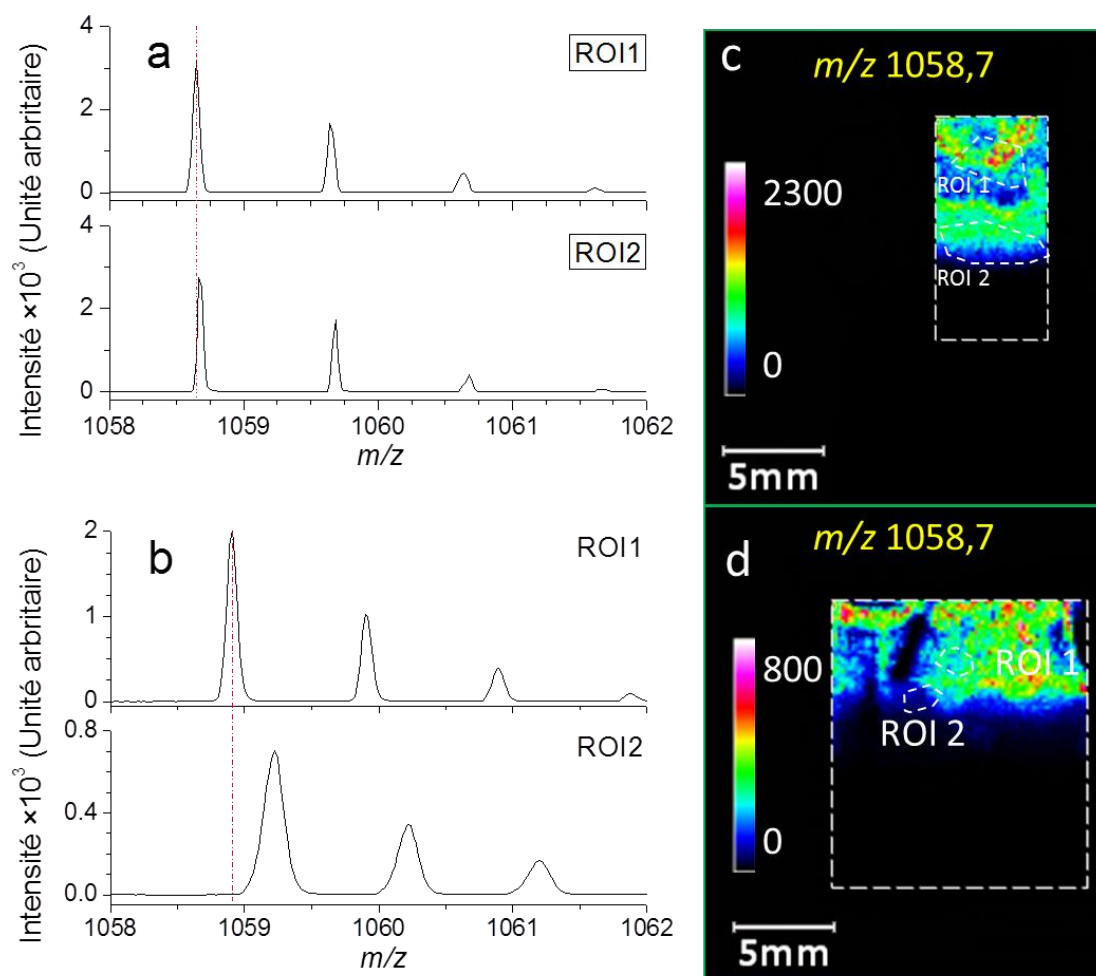


Figure 9 : (a) Spectre de masse des deux ROI : ROI1 dans la colonie bactérienne et ROI2 en dehors de la colonie bactérienne (zone de compétition), pour la préparation d'échantillon « méthode de dépôt direct » (mode positif) (b) Spectre de masse des deux ROI : ROI1 et ROI2 pour la préparation d'échantillon « méthode de dépôt direct » (mode positif) (c) Image MALDI (mode positif) de l'ion à m/z 1058,7, surfactine cationisée $[C_{53}H_{93}N_7O_{13}+Na]^+$ pour la préparation d'échantillon « méthode de transfert de la gélose » (d) Image MALDI (mode positif) de l'ion à m/z 1058,7, surfactine cationisée $[C_{53}H_{93}N_7O_{13}+Na]^+$ pour la préparation d'échantillon « méthode de transfert de la gélose ».

V.2.2. Influence de la distance entre les souches

L'influence de la distance entre les dépôts des deux souches mises en compétition a aussi été évaluée. La Figure 10 montre deux cartes de densité ionique de compétitions microbiennes qui ont été placées respectivement à 2,5 cm et à 1,5 cm de distance l'une de l'autre. Sur la Figure 10a qui correspond à l'image ionique de la distribution de la surfactine cationisée par le sodium à m/z 1058,7 $[C_{53}H_{93}N_7O_{13}+Na]^+$, peu de surfactine a été détectée si les souches sont inoculées à 2,5 cm de distance l'une de l'autre. Cependant, sur la Figure 10b qui correspond à une distance entre souches de 1,5 cm, la surfactine est détectée avec une plus grande intensité que dans le cas précédent. Cela implique que pour concentrer et détecter plus facilement les composés, il faut s'assurer que les colonies se rencontrent. Une distance de 1,5 cm entre les deux inoculations semble pour cela correcte, à ceci près que d'autres distances intermédiaires n'ont pas pu être testées.

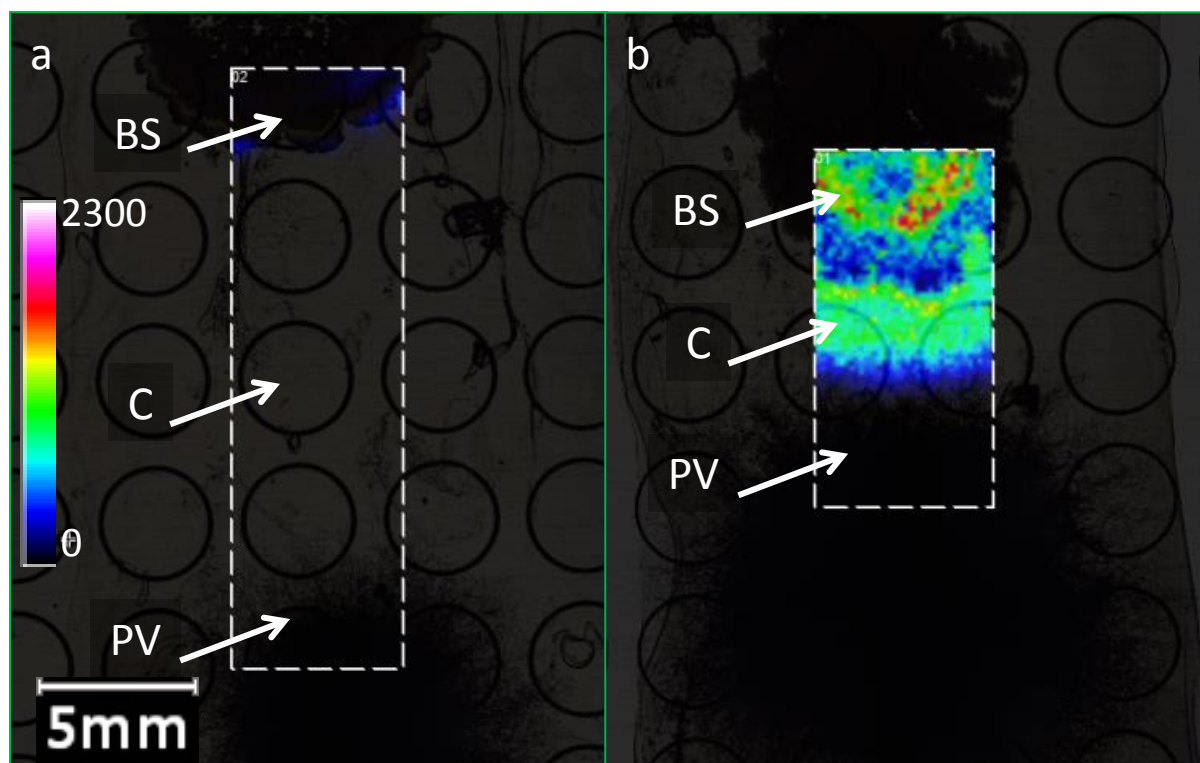


Figure 10 : (a) Image MALDI (mode positif) de l'ion à m/z 1058,7 à une distance entre les souches de 2,5 cm (b) Image MALDI (mode positif) de l'ion à m/z 1058,7 à une distance entre les souches de 1,5 cm. L'échantillon a été obtenu selon la méthode de dépôt direct. L'abréviation BS correspond à *B. subtilis*, C à la zone de compétition et PV à *P. variable*, la surface entre les souches correspond à la zone de compétition.

V.2.3. Préparation d'échantillon pour l'imagerie TOF-SIMS de compétitions microbiennes

Plusieurs essais ont été réalisés pour faire croître les compétitions directement sur de la gélose préalablement coulée sur une galette de silicium. Cette technique n'a finalement pas été retenue car le champignon a changé de forme. Une lame de verre recouverte d'oxyde d'indium-étain (lame ITO) a aussi été employée pour le support de la gélose mais après inoculation et incubation, les souches mouraient, certainement à cause de la toxicité des oxydes d'indium et d'étain. La stratégie de couper un morceau de gélose et de le déposer sur un support n'a pas été retenue à cause de la faible qualité des échantillons obtenue. De plus le relief apporté par le mycélium du champignon posait des problèmes d'un point de vue topographique. En effet pour assurer la meilleure résolution en masse possible, il est nécessaire que sur toute l'analyse le temps de vol des ions secondaires soit identique. Des tentatives ont été faites pour obtenir l'empreinte de la compétition. La face conductrice d'une galette de silicium a été déposée sur la compétition microbienne. La partie correspondant à la bactérie adhère facilement, mais le mycélium du champignon n'adhère aucunement. L'idée retenue a été de déposer dans une boîte de Petri la gélose et un morceau de papier filtre entre les souches et la gélose avant inoculation. Cette méthode permet de récupérer et sécher l'empreinte de la compétition facilement. La Figure 11 illustre les étapes de montage de l'échantillon. La zone souhaitée pour analyse est délicatement coupée à l'aide d'un scalpel, et est ensuite collée à l'aide d'un ruban adhésif double face conducteur.

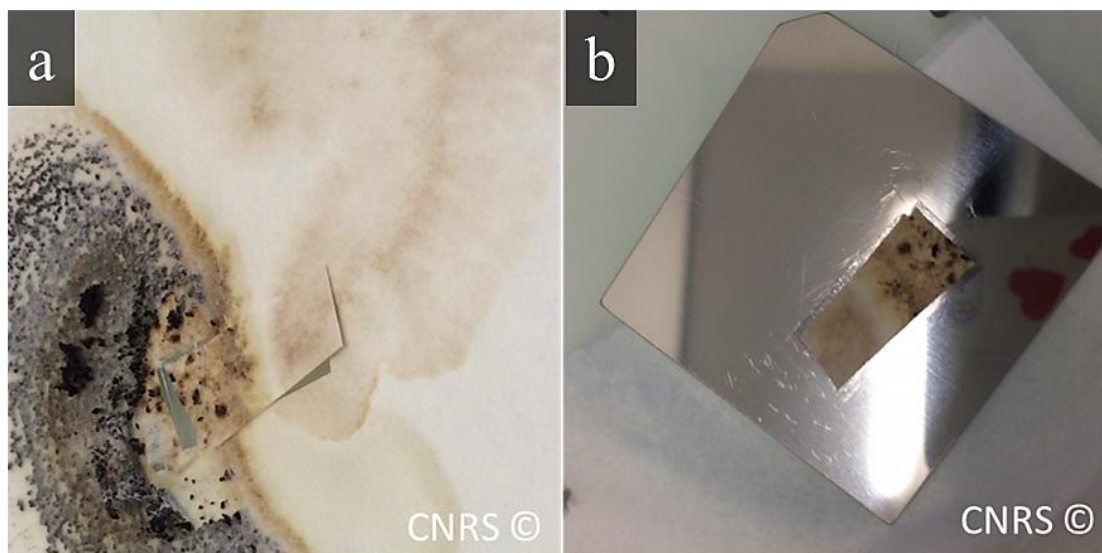


Figure 11 : Montage de l'échantillon destiné à l'imagerie TOF-SIMS. a) le papier filtre sur lequel la compétition a crû est découpé à l'aide d'un scalpel. b) L'échantillon est collé à l'aide d'un ruban adhésif double face conducteur.

Par la suite, l'échantillon est analysé en mode *stage scan* sur une surface de $30000 \times 1000 \mu\text{m}$ (le porte échantillon se déplaçant par pas de $500 \mu\text{m}$). La taille des pixels est de $8 \mu\text{m}$. L'acquisition ne nécessitant pas d'une haute résolution spatiale, a alors été analysée en mode HCBU. Les images ont été acquises à l'aide d'une dose d'ions primaires de $2,87 \times 10^9 \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$. Bien qu'il ait été rapporté dans la thèse de Delphine Debois que l'utilisation du canon à électron endommage les surfactines [12], celui-ci a tout de même été utilisé. En effet, et contrairement aux expériences de Delphine Debois, la surface à analyser est ici isolante, et il n'est donc pas possible de s'affranchir du flux d'électrons.

V.2.4. Méthodes pour l'analyse des produits isolés

V.2.4.a. MALDI-TOF

Les différentes solutions de standards isolés des compétitions microbiennes ont été mélangées avec une solution de matrice (Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique [CHCA] à $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ dans de l'acétonitrile/ H_2O /Acide TriFluoroAcétique 70/30/0,1 v:v:v). Finalement, la concentration de chaque standard est de $100 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Suivant la méthode de la goutte sèche [36], $2 \mu\text{L}$ de chacune de ces solutions ont été déposés sur une plaque MALDI.

Un spectromètre de masse MALDI TOF/TOF UltrafleXtreme (Bruker Daltonique, Wissembourg, France) a été employé pour l'analyse. L'étalonnage du spectromètre a été réalisé en mode positif à l'aide d'un mélange de peptides contenant la Bradykinine [m/z 573,31], la Bradykinine [1-7] (m/z 757,40), la Bradykinine (m/z 1060,57), l'Angiotensine (m/z 1296,68) et de la Neurotensine (m/z 1672,91) (solution commerciale PepMix 5, LaserBio Labs, Sophia Antipolis, France). L'étalonnage a été effectué en externe sur les 5 pics du PepMix 5 avec l'algorithme « Cubic Enhanced », une précision en masse moyenne de 1,5 ppm a été mesurée sur ces étalons.

V.2.4.b. TOF-SIMS

Un standard de surfactine dissous dans du THF pur à $1 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ a été analysé par spectrométrie de masse TOF-SIMS selon ces conditions suivantes : Courant de Bi_3^+ 0,13 pA, zone de $150 \mu\text{m} \times 150 \mu\text{m}$ et $128 \text{ pixels} \times 128 \text{ pixels}$, avec une dose de $2,0 \times 10^{11} \text{ ions}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Une gamme de $7,5 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; $0,75 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; $0,075 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ et de $0,0075 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ du mélange des deux acides tétroniques a aussi été analysée par TOF-SIMS. Les conditions sont légèrement différentes, en effet pour éviter que le détecteur soit saturé le courant de Bi_3^+ a été diminué (en diminuant la durée des impulsions d'ions primaires, appelée « width » dans le logiciel de pilotage). Les conditions sont alors les suivantes : Courant de Bi_3^+ 0,06 pA, zone de $150 \mu\text{m} \times 150 \mu\text{m}$ et $128 \text{ pixels} \times 128 \text{ pixels}$, avec une dose de $2,0 \times 10^{11} \text{ ions}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Dans les deux cas, les échantillons sont déposés sur une surface d'or.

V.3. Résultats

V.3.1. Analyse des standards

Avant de procéder à l'analyse des surfaces des compétitions microbiennes, l'analyse de composés extraits du champignon *P. variable* a été effectuée. Bien qu'il soit préférable de retraiter les acquisitions d'imagerie sans *a priori*, détecter les molécules présentes dans ces extraits serait intéressant, car l'activité inhibitrice de *B. subtilis* par ces molécules a été mesurée par nos collaboratrices.

V.3.1.a. MALDI-TOF

L'analyse par MALDI-TOF du mélange d'acide tétronique a permis de détecter les ions $[\text{M}+\text{H}]^+$; $[\text{M}+\text{Na}]^+$; $[\text{M}+\text{K}]^+$ et $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ de l'alcène (Figure 6b) à respectivement m/z 263,13 ; 285,11 ; 301,09 ; 547,23 (Figure 12). L'attribution, la formule et la déviation standard en ppm de chaque ion détecté ont été rassemblés dans le Tableau 1. Cependant, aucun ion pouvant être attribué à l'alcool n'a été détecté. La Figure 13 montre le spectre MALDI-MS/MS de l'ion à m/z 263. L'ion détecté à m/z 245 correspond à une perte d' H_2O et les ions à m/z 221 ; 203 et 177 correspondent à une perte de propylène suivi d'une d'hydratation et d'une décarboxylation.

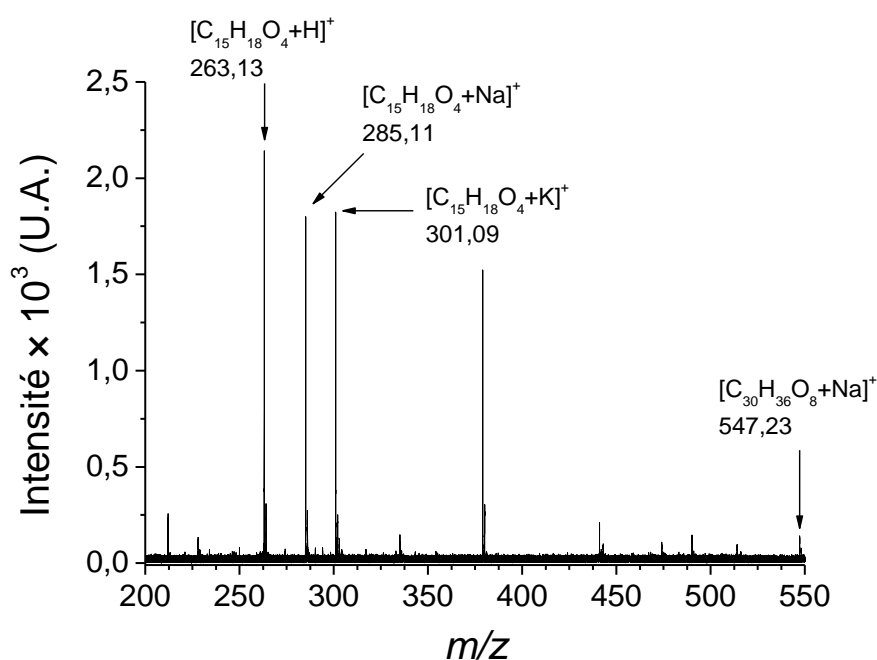


Figure 12 : Spectre de masse MALDI-TOF du mélange d'acide tétronique. m/z 263,13 $[M+H]^+$ $C_{15}H_{18}O_4+H^+$; m/z 285,11 $[M+Na]^+$ $C_{15}H_{18}O_4+Na^+$; m/z 301,09 $[M+K]^+$ $C_{15}H_{18}O_4+K^+$; m/z 547,23 $[2M+Na]^+$ $C_{30}H_{36}O_8+Na^+$.

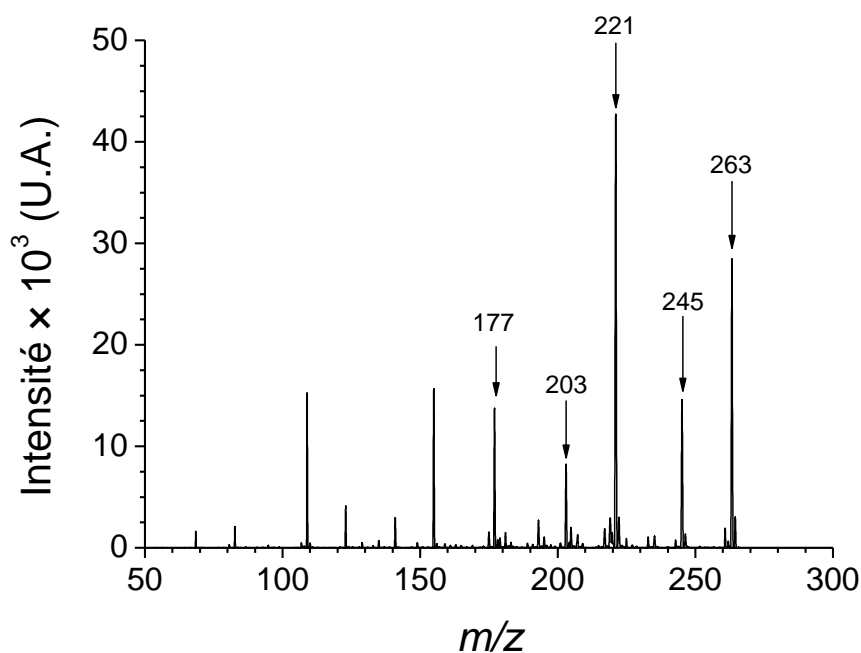


Figure 13 : Spectre MALDI-TOF/TOF des ions fragments de l'ion à m/z 263,16

La Figure 14 montre les spectres MALDI-TOF en modes positif et négatif d'un standard de surfactine. En mode positif, les molécules cationisées par le sodium et par le potassium ont été détectées. En mode négatif, ce sont uniquement les molécules déprotonées qui sont

détectées. Les surfactines détectées ont une chaîne carbonée de 12 à 16 carbones. En mode positif, les surfactines avec une chaîne comprenant 12 et 16 carbones n'ont pas été détectées quel que soit l'adduit. En mode négatif, toutes les longueurs de chaînes ont été détectées sauf celle à 16 carbones. Le Tableau 1 résume les attributions faites pour chaque ion détecté.

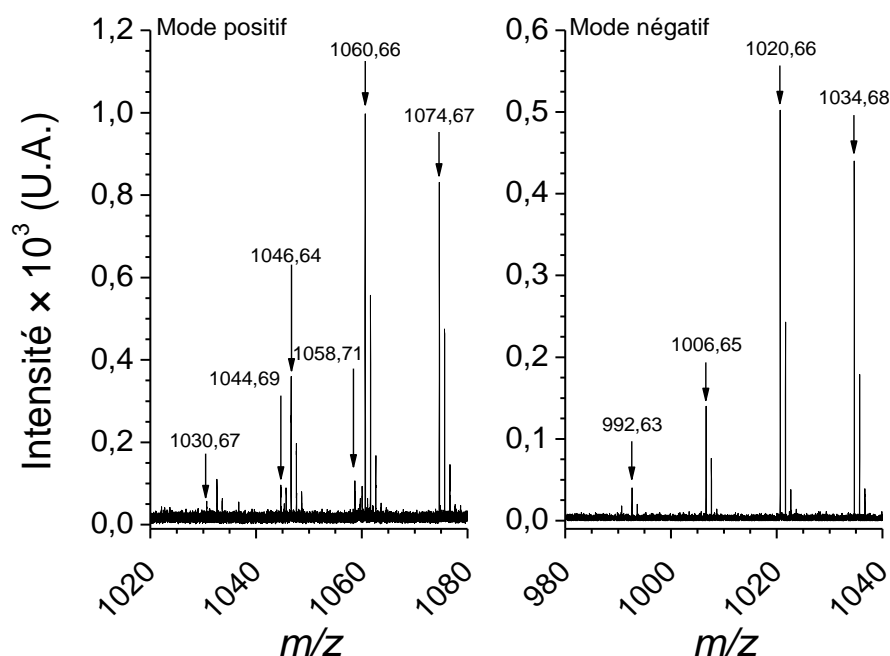


Figure 14 : Spectre MALDI-TOF d'un standard de surfactine à $1 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Le spectre de gauche a été obtenu en polarité positive alors que le spectre de droite a été obtenu en polarité négative. Mode positif : m/z 1030,67 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $\text{C}_{51}\text{H}_{89}\text{N}_7\text{O}_{13}+\text{Na}^+$; m/z 1044,69 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $\text{C}_{52}\text{H}_{91}\text{N}_7\text{O}_{13}+\text{Na}^+$; m/z 1046,64 $[\text{M}+\text{K}]^+$ $\text{C}_{51}\text{H}_{89}\text{N}_7\text{O}_{13}+\text{K}^+$; m/z 1058,71 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $\text{C}_{53}\text{H}_{93}\text{N}_7\text{O}_{13}+\text{Na}^+$; m/z 1060,66 $[\text{M}+\text{K}]^+$ $\text{C}_{52}\text{H}_{91}\text{N}_7\text{O}_{13}+\text{K}^+$; m/z 1074,67 $[\text{M}+\text{K}]^+$ $\text{C}_{53}\text{H}_{93}\text{K}_7\text{O}_{13}+\text{K}^+$. Mode négatif : m/z 992,63 $[\text{M}-\text{H}]^-$ $\text{C}_{50}\text{H}_{87}\text{N}_7\text{O}_{13}-\text{H}^-$; m/z 1006,65 $[\text{M}-\text{H}]^-$ $\text{C}_{51}\text{H}_{89}\text{N}_7\text{O}_{13}-\text{H}^-$; m/z 1020,66 $[\text{M}-\text{H}]^-$ $\text{C}_{52}\text{H}_{91}\text{N}_7\text{O}_{13}-\text{H}^-$; m/z 1034,68 $[\text{M}-\text{H}]^-$ $\text{C}_{53}\text{H}_{93}\text{N}_7\text{O}_{13}-\text{H}^-$.

Technique	Formule	m/z théorique	m/z mesuré	déviat standard (ppm)
Acide tétronique	$[C_{15}H_{18}O_4+H]^+$	263,13	263,13	-8,87
Acide tétronique	$[C_{15}H_{18}O_4+Na]^+$	285,11	285,11	9,54
Acide tétronique	$[C_{15}H_{18}O_4+K]^+$	301,08	301,09	2,60
Acide tétronique	$[(C_{15}H_{18}O_4)_2+Na]^+$	547,23	547,23	4,04
Surfactine-C ₁₃	$[C_{51}H_{89}N_7O_{13}+Na]^+$	1030,64	1030,68	12,02
Surfactine-C ₁₄	$[C_{52}H_{91}N_7O_{13}+Na]^+$	1044,66	1044,69	7,41
Surfactine-C ₁₃	$[C_{51}H_{89}N_7O_{13}+K]^+$	1046,62	1046,64	7,12
Surfactine-C ₁₅	$[C_{53}H_{93}N_7O_{13}+Na]^+$	1058,67	1058,72	29,37
Surfactine-C ₁₄	$[C_{52}H_{91}N_7O_{13}+K]^+$	1060,63	1060,66	17,73
Surfactine-C ₁₅	$[C_{53}H_{93}N_7O_{13}+K]^+$	1074,65	1074,67	6,66
Surfactine-C ₁₂	$[C_{50}H_{85}N_7O_{13}-H]^-$	992,63	992,64	7,69
Surfactine-C ₁₃	$[C_{51}H_{87}N_7O_{13}-H]^-$	1006,64	1006,65	9,92
Surfactine-C ₁₄	$[C_{52}H_{89}N_7O_{13}-H]^-$	1020,66	1020,66	1,31
Surfactine-C ₁₅	$[C_{53}H_{91}N_7O_{13}-H]^-$	1034,68	1034,69	9,36

Tableau 1 : Récapitulatif de toutes les attributions et déviat standard en ppm pour les ions détectés après analyse de standard par MALDI-TOF.

V.3.1.b. TOF-SIMS

La Figure 15a montre le spectre de masse TOF-SIMS en mode positif du mélange d'acide tétronique. Des ions sont détectés à m/z 263,12 ; m/z 285,10 ; m/z 301,07 ; m/z 525,23 ; m/z 547,21, correspondant respectivement aux ions $[M+H]^+$; $[M+Na]^+$; $[M+K]^+$; $[2M+H]^+$; $[2M+Na]^+$; $[2M+K]^+$. Aucun ion attribué à la structure présentée en Figure 6a n'a été détecté. La technique TOF-SIMS a montré qu'il était possible de détecter en mode négatif l'ion $[M-H]^-$ correspondant à la molécule déprotonée de l'alcène, son spectre est présenté en Figure 15b. Le Tableau 2 résume les attributions, les formules et les déviations standards en ppm pour chacun des ions détectés dans ce mélange.

L'analyse TOF-SIMS en mode positif d'un standard de surfactines a permis de détecter à la fois les molécules protonées et les molécules cationisées par le sodium ou par le potassium, correspondant à différentes surfactines (Figure 16a). En revanche, l'analyse en mode négatif a permis de détecter uniquement les molécules déprotonées de ces mêmes surfactines. Les formules et les déviations standards en ppm pour chaque ion détecté sont indiquées dans le Tableau 3.

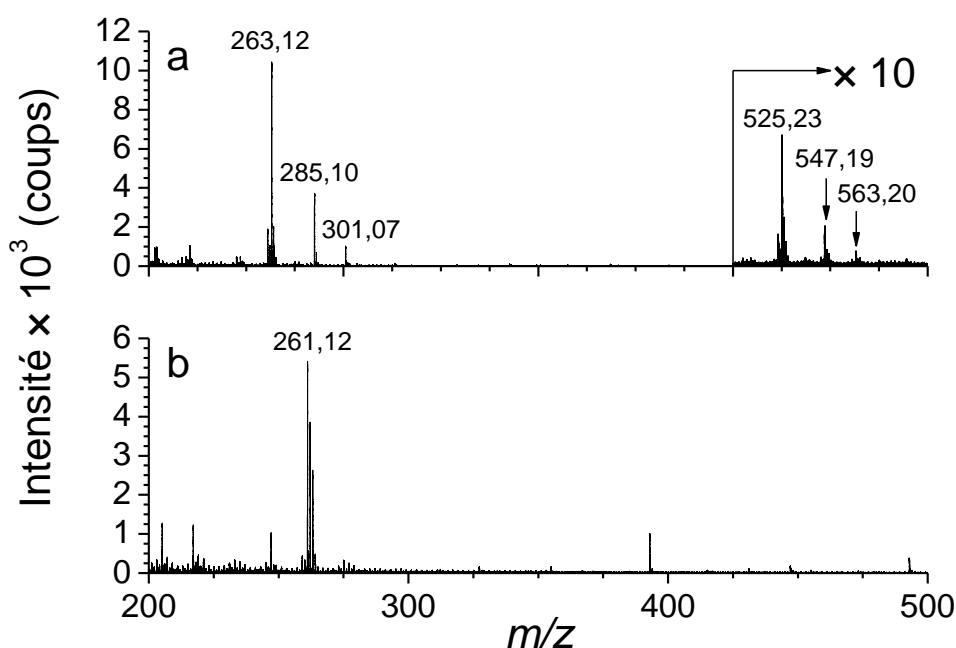


Figure 15 : Spectres de masse TOF-SIMS du mélange d'acide tétronique à $0,75 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a) mode positif, les annotations sont les suivantes 1) m/z 263,12 $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_4+\text{H}^+$ 2) m/z 285,10 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_4+\text{Na}^+$ 3) m/z 301,07 $[\text{M}+\text{K}]^+$ $[\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_4+\text{K}]^+$ 4) m/z 525,23 $[2\text{M}+\text{H}]^+$ $[\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{O}_8+\text{H}]^+$ 5) m/z 547,19 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ $[\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{O}_8+\text{Na}]^+$ 6) m/z 563,20 $[2\text{M}+\text{K}]^+$ $[\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{O}_8+\text{K}]^+$ b) mode négatif, l'annotation est la suivante 7) m/z 261,12 $[\text{M}-\text{H}]^-$ $[\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_4-\text{H}]^-$.

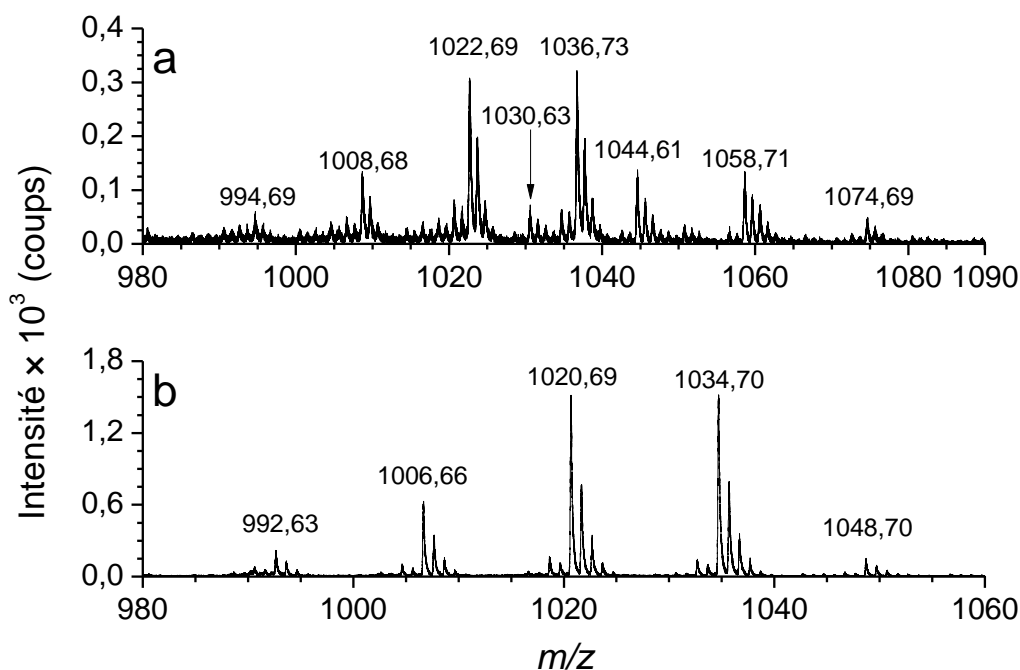


Figure 16 : Spectre TOF-SIMS d'un standard de surfactines à $1 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ a) mode positif, les annotations sont les suivantes : 1) m/z 994,69 $[\text{M}+\text{H}]^+$ $[\text{C}_{50}\text{H}_{87}\text{N}_7\text{O}_{13}+\text{H}]^+$ 2) m/z 1008,68 $[\text{M}+\text{H}]^+$ $[\text{C}_{51}\text{H}_{89}\text{N}_7\text{O}_{13}+\text{H}]^+$ 3) m/z 1022,69 $[\text{M}+\text{H}]^+$ $[\text{C}_{52}\text{H}_{91}\text{N}_7\text{O}_{13}+\text{H}]^+$ 4) m/z 1030,63 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $[\text{C}_{51}\text{H}_{89}\text{N}_7\text{O}_{13}+\text{Na}]^+$ 5) m/z 1036,73 $[\text{M}+\text{H}]^+$ $[\text{C}_{53}\text{H}_{93}\text{N}_7\text{O}_{13}+\text{H}]^+$ 6) m/z 1044,61 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $[\text{C}_{52}\text{H}_{91}\text{N}_7\text{O}_{13}+\text{Na}]^+$ 7) m/z 1058,71 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $[\text{C}_{53}\text{H}_{93}\text{N}_7\text{O}_{13}+\text{Na}]^+$ 8) m/z 1074,69 $[\text{M}+\text{K}]^+$ $[\text{C}_{53}\text{H}_{93}\text{N}_7\text{O}_{13}+\text{K}]^+$ b) mode négatif, les annotations sont les suivantes : 9) m/z 992,63 $[\text{M}-\text{H}]^-$ $[\text{C}_{50}\text{H}_{86}\text{N}_7\text{O}_{13}-\text{H}]^-$ 10) m/z 1006,66 $[\text{M}-\text{H}]^-$ $[\text{C}_{51}\text{H}_{89}\text{N}_7\text{O}_{13}-\text{H}]^-$ 11) m/z 1020,69 $[\text{M}-\text{H}]^-$ $[\text{C}_{52}\text{H}_{91}\text{N}_7\text{O}_{13}-\text{H}]^-$ 12) m/z 1034,70 $[\text{M}-\text{H}]^-$ $[\text{C}_{53}\text{H}_{93}\text{N}_7\text{O}_{13}-\text{H}]^-$ 13) m/z 1048,70 $[\text{M}-\text{H}]^-$ $[\text{C}_{54}\text{H}_{95}\text{N}_7\text{O}_{13}-\text{H}]^-$

Nom	Formule	m/z théorique	m/z mesuré	dévi- ation standard (ppm)
Acide tétronique	$[C_{15}H_{18}O_4+H]^+$	263,13	263,12	-39,28
Acide tétronique	$[C_{15}H_{18}O_4+Na]^+$	285,11	285,10	-36,06
Acide tétronique	$[C_{15}H_{18}O_4+K]^+$	301,08	301,07	-53,86
Acide tétronique	$[(C_{15}H_{18}O_4)_2+H]^+$	525,25	525,23	-41,59
Acide tétronique	$[(C_{15}H_{18}O_4)_2+Na]^+$	547,23	547,19	-70,88
Acide tétronique	$[(C_{15}H_{18}O_4)_2+K]^+$	563,20	563,20	-17,27
Acide tétronique	$[C_{15}H_{16}O_4-H]^-$	261,11	261,12	35,67
Surfactine-C ₁₂	$[C_{50}H_{87}N_7O_{13}+H]^+$	994,64	994,69	46,23
Surfactine-C ₁₃	$[C_{51}H_{89}N_7O_{13}+H]^+$	1008,66	1008,68	20,16
Surfactine-C ₁₄	$[C_{52}H_{91}N_7O_{13}+H]^+$	1022,68	1022,69	10,45
Surfactine-C ₁₃	$[C_{51}H_{89}N_7O_{13}+Na]^+$	1030,64	1030,63	-14,17
Surfactine-C ₁₅	$[C_{53}H_{93}N_7O_{13}+H]^+$	1036,69	1036,72	30,90
Surfactine-C ₁₄	$[C_{52}H_{91}N_7O_{13}+Na]^+$	1044,66	1044,63	-23,22
Surfactine-C ₁₅	$[C_{53}H_{93}N_7O_{13}+Na]^+$	1058,67	1058,63	-41,47
Surfactine-C ₁₅	$[C_{53}H_{93}N_7O_{13}+K]^+$	1074,65	1074,69	42,95
Surfactine-C ₁₂	$[C_{50}H_{87}N_7O_{13}-H]^-$	992,63	992,63	4,67
Surfactine-C ₁₃	$[C_{51}H_{89}N_7O_{13}-H]^-$	1006,64	1006,66	11,91
Surfactine-C ₁₄	$[C_{52}H_{91}N_7O_{13}-H]^-$	1020,66	1020,69	32,66
Surfactine-C ₁₅	$[C_{53}H_{93}N_7O_{13}-H]^-$	1034,68	1034,70	19,99
Surfactine-C ₁₆	$[C_{54}H_{95}N_7O_{13}-H]^-$	1048,69	1048,70	12,43

Tableau 2 : Récapitulatif de toutes les attributions et déviation standard en ppm pour les ions détectés après analyse de standard par TOF-SIMS.

V.3.2. Imagerie MALDI-TOF

Aucun ion correspondant aux acides tétroniques n'a été détecté sur le spectre moyen de l'image. Pourtant, des surfactines ont été détectées et identifiées. La Figure 17 représente le spectre moyen de la compétition préparée par dépôt direct de la gélose sur la plaque MALDI et le Tableau 3 récapitule les attributions qui ont été proposées pour ces signaux. Parmi ces pics caractéristiques des surfactines, deux ont été attribués à une surfactine en C15 hydrolysée et cationisée par le sodium et par le potassium, détectés respectivement à m/z 1076,68 et 1092,65. Bien que la précision en masse de l'ensemble des surfactines permette une bonne attribution, il reste néanmoins important de confirmer ces attributions *via* une analyse structurale MS/MS et l'analyse d'un standard.

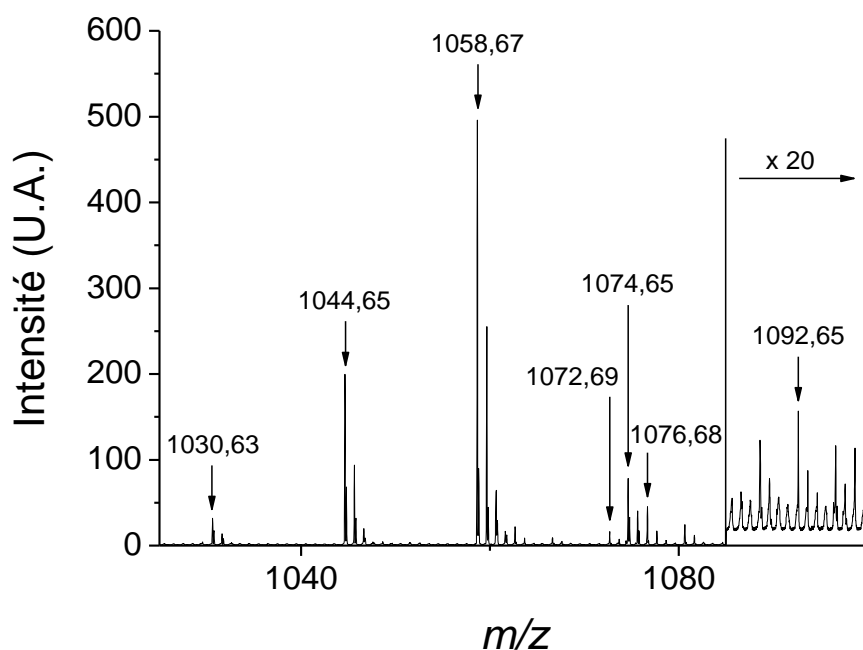


Figure 17 : Spectre de masse de l'image entre m/z 1025 et 1100. On détecte 7 pics attribués (Voir Tableau 3) aux surfactines (mode positif). $[C_{51}H_{89}N_7O_{13}+Na]^+$ à m/z 1030,63 ; $[C_{52}H_{91}N_7O_{13}+Na]^+$ à m/z 1044,65 ; $[C_{53}H_{93}N_7O_{13}+Na]^+$ à m/z 1058,67 ; $[C_{54}H_{95}N_7O_{13}+Na]^+$ à m/z 1072,69 ; $[C_{53}H_{93}N_7O_{13}+H_2O +Na]^+$ à m/z 1074,65 ; $[C_{53}H_{93}N_7O_{13}+H_2O +Na]^+$ à m/z 1076,68 ; $[C_{53}H_{93}N_7O_{13}+H_2O +K]^+$ à m/z 1092,65.

Annotation	Type	Formule	m/z théorique	m/z mesurée	déviat�on standard (ppm)
1	C13	$[C_{51}H_{89}N_7O_{13}+Na]^+$	1030,64	1030,63	-12,52
2	C14	$[C_{52}H_{91}N_7O_{13}+Na]^+$	1044,66	1044,65	-8,67
3	C15	$[C_{53}H_{93}N_7O_{13}+Na]^+$	1058,67	1058,67	-4,73
4	C16	$[C_{54}H_{95}N_7O_{13}+Na]^+$	1072,69	1072,69	-1,08
5	C15	$[C_{53}H_{93}N_7O_{13}+K]^+$	1074,65	1074,65	-0,97
6	C15	$[C_{53}H_{93}N_7O_{13}+H_2O +Na]^+$	1076,68	1076,68	0,68
7	C15	$[C_{53}H_{93}N_7O_{13}+H_2O +K]^+$	1092,66	1092,65	-5,32

Tableau 3 : Rapports masse sur charge calculés et mesurés (m/z) et calcul de la déviat on standard en ppm de chaque surfactine détectée sur le spectre de l'image MALDI-TOF (mode positif).

La Figure 18 montre les images des ions des différentes surfactines détectées. Plus la chaîne carbonée de la surfactine est courte, plus celle-ci est au centre de la colonie mère, et inversement plus la chaîne carbonée de la surfactine est longue, plus celle-ci est en dehors de la colonie mère. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par Debois *et al.* [11]. La surfactine hydrolysée a une distribution spatiale différente de la surfactine native : pour bien rendre compte de cela la Figure 19a et la Figure 19b montrent les superpositions en deux couleurs des images de la surfactine native en rouge et de la surfactine hydrolysée en vert

(molécules cationisées respectivement par le sodium et le potassium. Ces images montrent que certaines souches fongiques sont capables d'hydrolyser les surfactines comme dans les articles de Hoefler *et al.* et de Debois *et al.* [18,33]

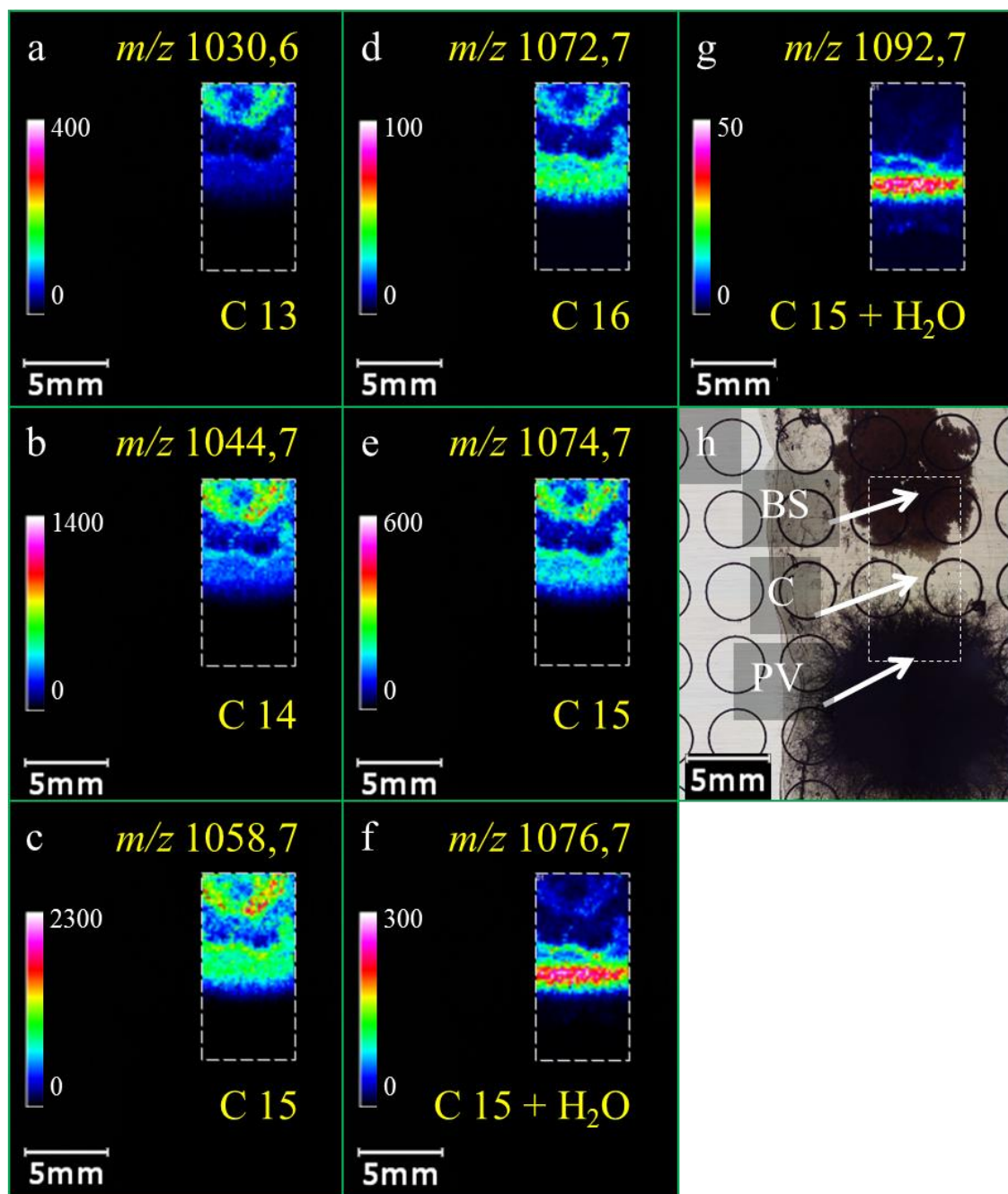


Figure 18 : Images (MALDI-TOF mode positif) des ions suivants : (a) Surfactine C13 $[M+Na]^+$ $C_{51}H_{89}N_7NaO_{13}^+$ m/z 1030,6 (b) Surfactine C14 $[M+Na]^+$ $C_{52}H_{91}N_7NaO_{13}^+$ m/z 1044,7 (c) Surfactine C15 $[M+Na]^+$ $C_{53}H_{93}N_7NaO_{13}^+$ m/z 1058,7 (d) Surfactine C16 $[M+Na]^+$ $C_{54}H_{95}N_7NaO_{13}^+$ m/z 1072,7 (e) Surfactine C15 $[M+K]^+$ $C_{53}H_{93}KN_7O_{13}^+$ m/z 1074,7 (f) Surfactine C15 hydrolysée $[M+H_2O+Na]^+$ $C_{53}H_{95}N_7NaO_{14}^+$ m/z 1076,7 (g) Surfactine C15 hydrolysée $[M+H_2O+K]^+$ $C_{53}H_{95}KN_7O_{14}^+$ m/z 1092,7 (h) image optique de l'échantillon où le rectangle blanc représente la zone qui a été analysée. L'abréviation BS correspond à *B. subtilis*, C à la zone de compétition et PV à *P. variable*, la surface entre les souches correspond à la zone de compétition.

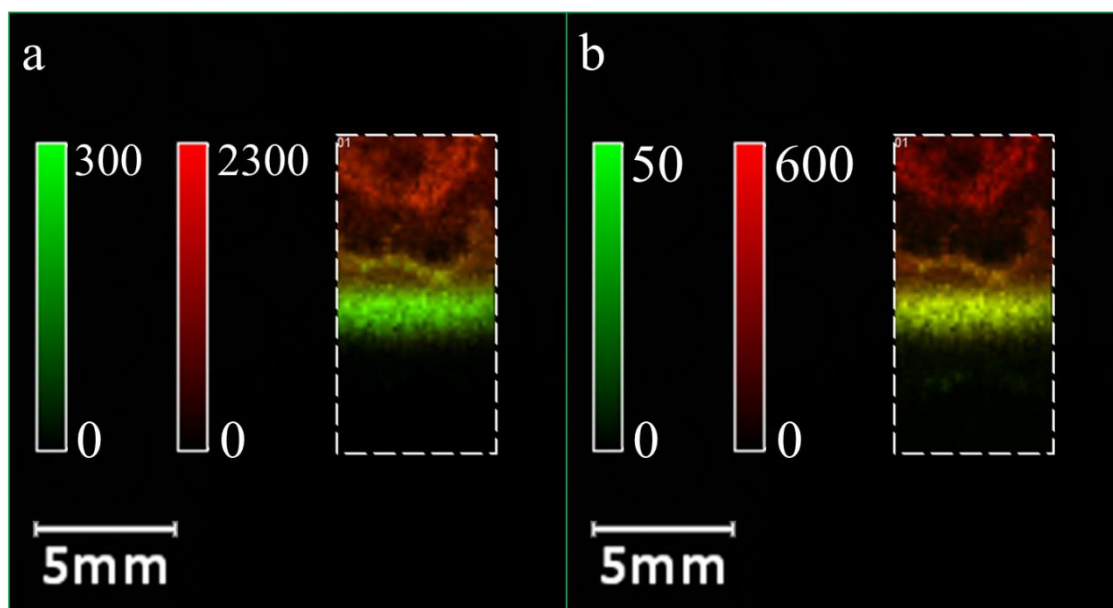


Figure 19 : (a) Superposition deux couleurs des images (MALDI-TOF mode positif) en rouge Surfactine C15 $[M+Na]^+ C_{53}H_{93}N_7NaO_{13}^+ m/z 1058,7$ et en vert Surfactine C15 hydrolysée $[M+H_2O+Na]^+ C_{53}H_{95}N_7NaO_{14}^+ m/z 1076,7$
 (b) Superposition deux couleurs des images (MALDI-TOF mode positif) en rouge Surfactine C15 $[M+K]^+ C_{53}H_{93}KN_7O_{13}^+ m/z 1074,7$ et en vert Surfactine C15 hydrolysée $[M+H_2O+K]^+ C_{53}H_{95}KN_7O_{14}^+ m/z 1092,7$

En plus des surfactines, des ions ont été détectés à des rapports masse-sur-charge plus élevés (Figure 20). Après recherche dans la littérature, Watrous *et al.* ont détecté d'autres métabolites, notamment la plipastatine (Figure 21) à l'aide de l'imagerie DESI [22]. Il est probable que ces pics correspondent à des lipopeptides, certainement des plipastatines, mais cela ne reste qu'à l'état d'hypothèse en l'absence d'une analyse MS/MS pour identifier et affirmer la nature de ces ions. Le Tableau 4 récapitule les attributions qui ont été proposées pour ces signaux. Les images correspondantes sont présentées en Figure 22, montrant que l'ensemble de ces ions sont distribués au niveau de la zone de compétition.

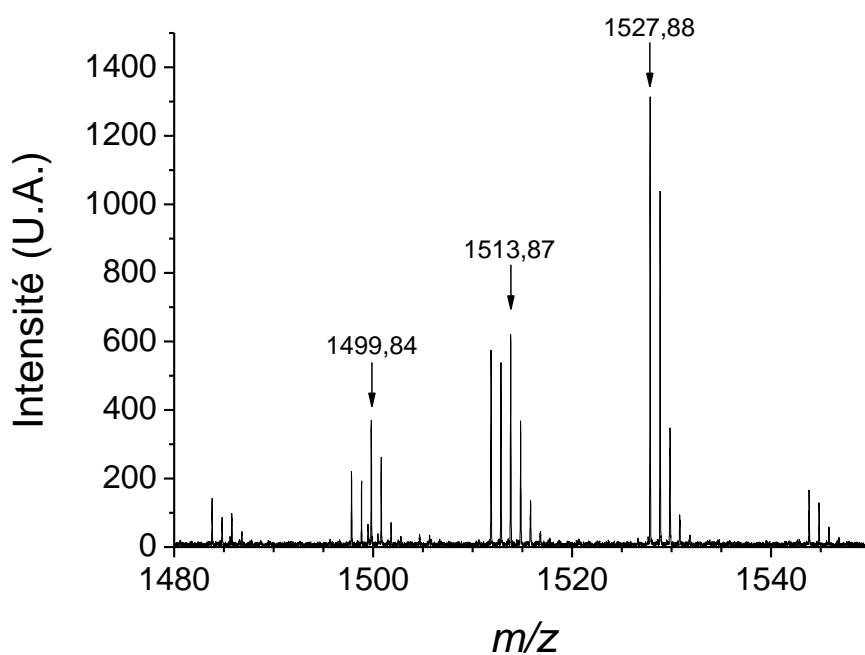


Figure 20 : Spectre de masse de l'image MALDI-TOF entre m/z 1480 et 1550. Ces pics peuvent être attribués à la plipastatine (Polarité positive). $[C_{73}H_{112}N_{12}O_{20}+Na]^+$ à m/z 1499,84 2) ; $[C_{74}H_{114}N_{12}O_{20}+Na]^+$ à m/z 1513,87 ; $C_{75}H_{116}N_{12}O_{20}+Na]^+$ à m/z 1527,88

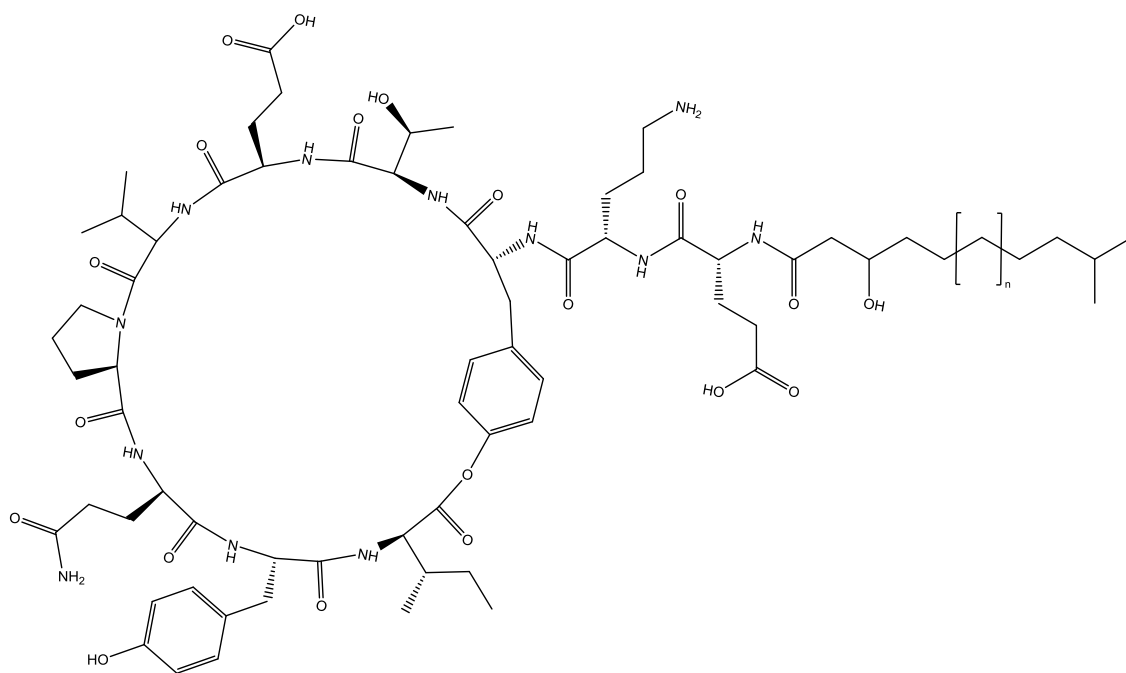


Figure 21 : Formule développée de la plipastatine (n=5-7)

Annotation	Type	Formule	m/z théorique	m/z mesurée	déviati on standard (ppm)
1	C15	$[C_{73}H_{112}N_{12}O_{20}+Na]^+$	1499,80	1499,82	13,3
2	C16	$[C_{74}H_{114}N_{12}O_{20}+Na]^+$	1513,82	1513,83	6,61
3	C17	$[C_{75}H_{116}N_{12}O_{20}+Na]^+$	1527,83	1527,84	6,55

Tableau 4 : Rapports masse-sur-charge calculés, mesurés (m/z) et calcul de la déviation standard en ppm de chacun des ions détectés en imagerie MALDI-TOF (mode positif) et attribués à des plipastatines.

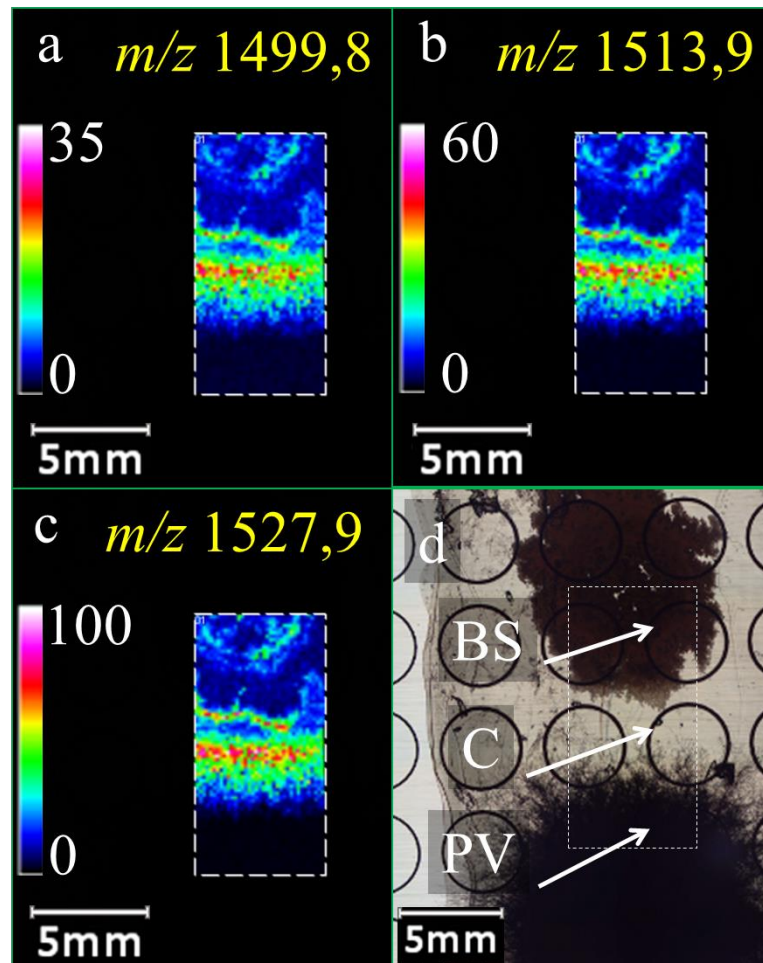


Figure 22 : (a-c) Cartes de densité ionique (MALDI-TOF) des 3 pics principaux détectés entre m/z 1480 et 1550. (a) Plipastatine C15 $[M+Na]^+ C_{73}H_{112}N_{12}NaO_{20}^+ m/z$ 1499,8 (b) Plipastatine C16 $[M+Na]^+ C_{74}H_{114}N_{12}NaO_{20}^+ m/z$ 1513,9 (c) Plipastatine C17 $[M+Na]^+ C_{75}H_{116}N_{12}NaO_{20}^+ m/z$ 1527,9 (c) image optique de l'échantillon le carré blanc représente la zone qui a été analysée. L'abréviation BS correspond à *B. subtilis*, C à la zone de compétition et PV à *P. variable*, la surface entre les souches correspond à la zone de compétition.

V.3.3. Imagerie TOF-SIMS

Le choix de la méthode de préparation d'échantillon pour l'imagerie TOF-SIMS a été plus restreint. La première méthode essayée était de produire l'empreinte de la compétition sur une galette de silicium, mais le mycélium du champignon était trop sec et n'adhérait pas sur la galette. Finalement, une compétition ayant crû sur du papier filtre a été découpée puis collée sur une plaque en inox à l'aide d'un adhésif double face conducteur. La Figure 23

montre une superposition d'une image microscope ($\times 1,25$) de l'échantillon et d'une photographie de la zone découpée.

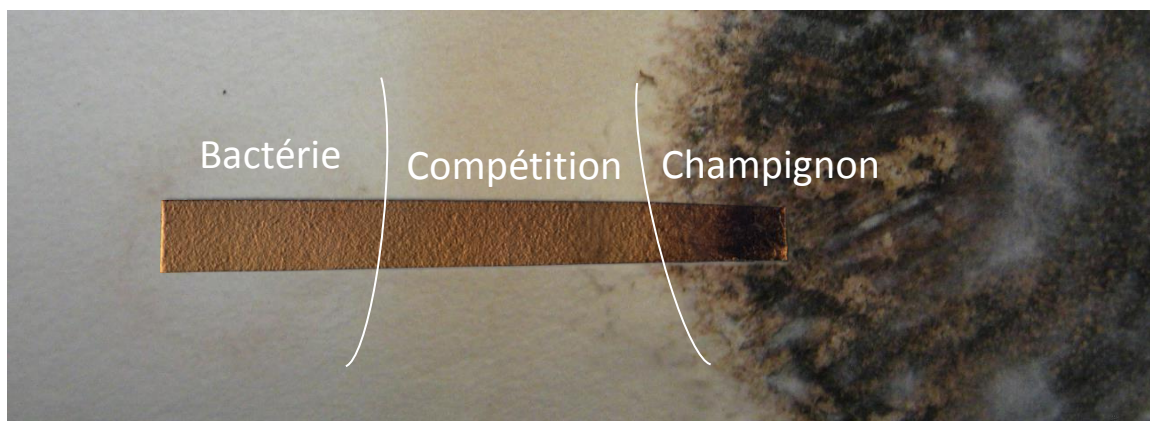


Figure 23 : Superposition d'une photographie de l'échantillon (découpe de la compétition ayant crû sur du papier filtre) enregistrée avec la caméra du microscope ($\times 1,25$), et d'une photographie de la compétition microbienne.

Aucun fragment caractéristique de l'acide tétronique n'a été détecté dans le spectre de masse global de l'image. Cependant, tout comme en imagerie MALDI, nous avons détecté et identifié un certain nombre de surfactines. La Figure 24 montre le spectre de masse de l'image acquise en mode négatif entre m/z 980 et m/z 1080, on peut y distinguer 6 pics qui correspondent à des surfactines déprotonées dont la longueur de la chaîne carbonée varie entre 12 et 15 carbones (Tableau 5).

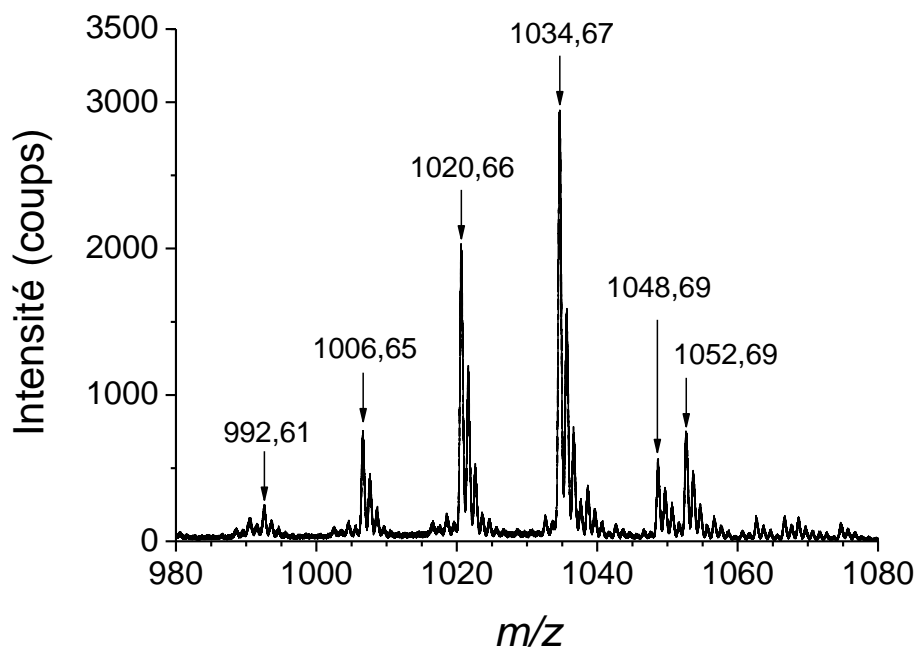


Figure 24 : Spectre de masse TOF-SIMS de la totalité de l'image (mode négatif) entre m/z 980 et 1080. 6 pics sont attribués à des ions de surfactines (Voir Tableau 5).

Type	Formule	m/z théorique	m/z mesurée	déviati on standard (ppm)
C12	$[C_{50}H_{85}N_7O_{13}-H]^-$	992,6284	992,6105	-18,03
C13	$[C_{51}H_{87}N_7O_{13}-H]^-$	1006,6440	1006,6490	4,97
C14	$[C_{52}H_{89}N_7O_{13}-H]^-$	1020,6597	1020,6641	4,31
C15	$[C_{53}H_{91}N_7O_{13}-H]^-$	1034,6753	1034,6740	-1,26
C16	$[C_{54}H_{93}N_7O_{13}-H]^-$	1048,6910	1048,6859	-4,86
C15	$[C_{53}H_{93}N_7O_{13}+H_2O-H]^-$	1052,6859	1052,6888	2,75

Tableau 5 : Rapports masse sur charge calculés et mesurés (m/z) et calcul de la déviati on standard en ppm de chaque ion de surfactine détecté lors de l'acquisition de l'image MALDI-TOF (mode positif).

La Figure 25 montre une superposition deux couleurs des images de la surfactine C15 native $C_{53}H_{92}N_7O_{13}^- [M-H]^-$ en rouge et de la surfactine C15 hydrolysée $C_{53}H_{94}N_7O_{14}^- [M-H]^-$ en vert. La distribution de la surfactine native est exclusivement située au niveau de la colonie bactérienne et la surfactine hydrolysée se localise quant à elle exclusivement au niveau de la zone de compétition.

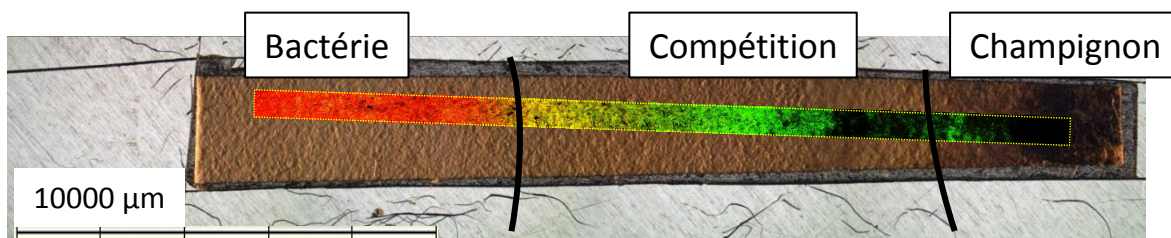


Figure 25 : Superposition deux couleurs des images (TOF-SIMS mode négatif) en rouge Surfactine C15 $[M-H]^- C_{53}H_{92}N_7O_{13}^-$ m/z 1034,7 et en vert Surfactine C15 hydrolysée $[M-H]^- C_{53}H_{94}N_7O_{14}^-$ m/z 1054,7.

La Figure 26 présente les zones où ont été dessinées des ROIs et les spectres de masse correspondants. On observe bien une diminution du rapport d'intensité entre les pics des surfactines natives et ceux des surfactines hydrolysées, correspondant aux signaux à m/z 1034,7 et 1054,7 jusqu'à une disparition de la présence des surfactines au niveau du champignon, caractérisé par les ROI 5 et 6.

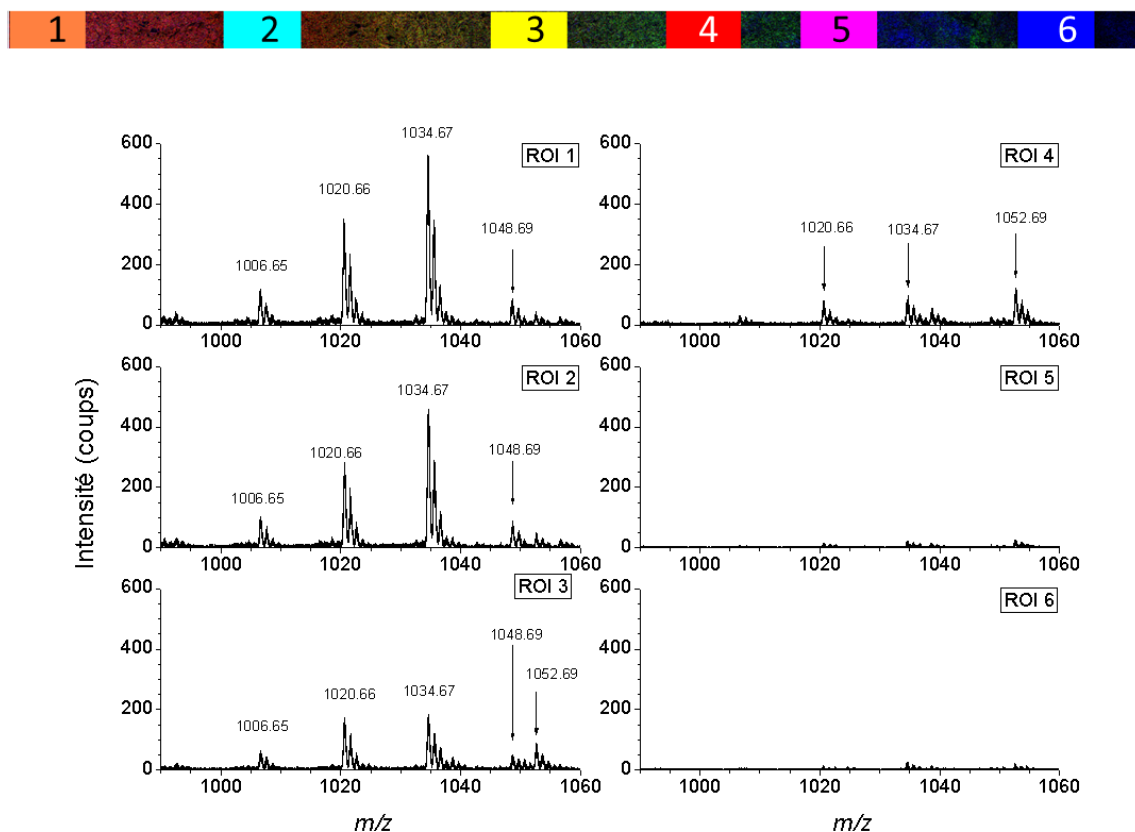


Figure 26 : Superposition deux couleurs des images (TOF-SIMS mode négatif) en rouge Surfactine C15 $[M-H]^-$ $C_{53}H_{92}N_7O_{13}^-$ m/z 1034,7 et en vert Surfactine C15 hydrolysée $[M-H]^-$ $C_{53}H_{92}N_7O_{13}^-$ m/z 1054,7 sur laquelle sont indiquées les ROIs qui ont été dessinées. Spectres correspondants à ces ROIs.

La Figure 27 représente un zoom entre m/z 1025 et m/z 1100 du spectre de masse global de l'image acquise en mode positif. On peut y distinguer 6 pics qui correspondent à des surfactines cationisées par le sodium ou par le potassium, et dont la longueur de la chaîne carbonée varie entre 12 et 15 carbones (Tableau 6). Parmi les ions de surfactines qui sont détectés, deux correspondent aux ions $[M+Na]^+$ et $[M+K]^+$ de la surfactine C15 hydrolysée., ces résultats permettent de confirmer ceux de l'étude MALDI.

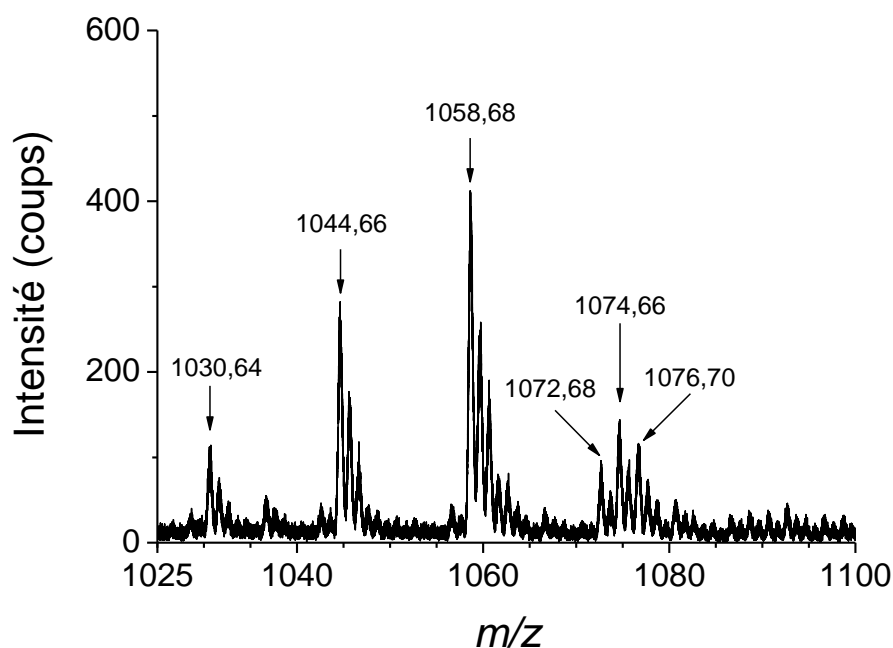


Figure 27 : Spectre de masse TOF-SIMS de l'image (mode positif) entre m/z 1025 et 1100. On observe 6 pics attribués aux surfactines (Voir Tableau 6).

type	Formule	m/z théorique	m/z mesurée	déviat ion standard (ppm)
C13	$[\text{C}_{51}\text{H}_{89}\text{N}_7\text{O}_{13}+\text{Na}]^+$	1030,6416	1030,6442	2,5
C14	$[\text{C}_{52}\text{H}_{91}\text{N}_7\text{O}_{13}+\text{Na}]^+$	1044,6573	1044,6625	5,0
C15	$[\text{C}_{53}\text{H}_{93}\text{N}_7\text{O}_{13}+\text{Na}]^+$	1058,6729	1058,6753	2,3
C16	$[\text{C}_{54}\text{H}_{95}\text{N}_7\text{O}_{13}+\text{Na}]^+$	1072,6886	1072,6822	-5,9
C15	$[\text{C}_{53}\text{H}_{93}\text{N}_7\text{O}_{13}+\text{K}]^+$	1074,6468	1074,6642	16,1
C15	$[\text{C}_{53}\text{H}_{93}\text{N}_7\text{NaO}_{13}+\text{H}_2\text{O} +\text{Na}]^+$	1076,6835	1076,6973	12,8
C15	$[\text{C}_{53}\text{H}_{93}\text{KN}_7\text{O}_{13}+\text{H}_2\text{O} +\text{K}]^+$	1092,6574	non détecté	

Tableau 6 : Rapports masse sur charge calculés et mesurés (m/z) et calcul de la déviat ion standard en ppm de chaque ion de surfactine détecté lors de l'acquisition de l'image TOF-SIMS (mode positif).

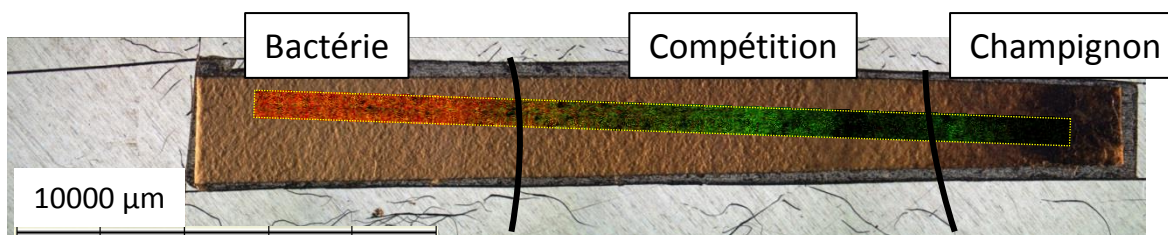


Figure 28 : Superposition deux couleurs des cartes de densité ionique (TOF-SIMS mode positif) en rouge Surfactine C15 $[M+Na]^+ C_{53}H_{93}N_7NaO_{13}^+ m/z 1058,7$ et en vert Surfactine C15 hydrolysée $[M+Na]^+ C_{53}H_{95}N_7NaO_{14}^+ m/z 1076,7$.

La Figure 28 montre avec une superposition en deux couleurs les images de la surfactine C15 native $[C_{53}H_{93}N_7O_{13}+Na]^+ [M+Na]^+$ en rouge et de la surfactine C15 hydrolysée $[C_{53}H_{95}N_7O_{14}+Na]^+ [M+Na]^+$ en vert. La surfactine native est exclusivement détectée au niveau de la colonie bactérienne et la surfactine hydrolysée se localise quant à elle exclusivement au niveau de la zone de compétition, ce qui coïncide totalement avec l'expérience TOF-SIMS en mode négatif ainsi qu'avec les expériences en MALDI-TOF.

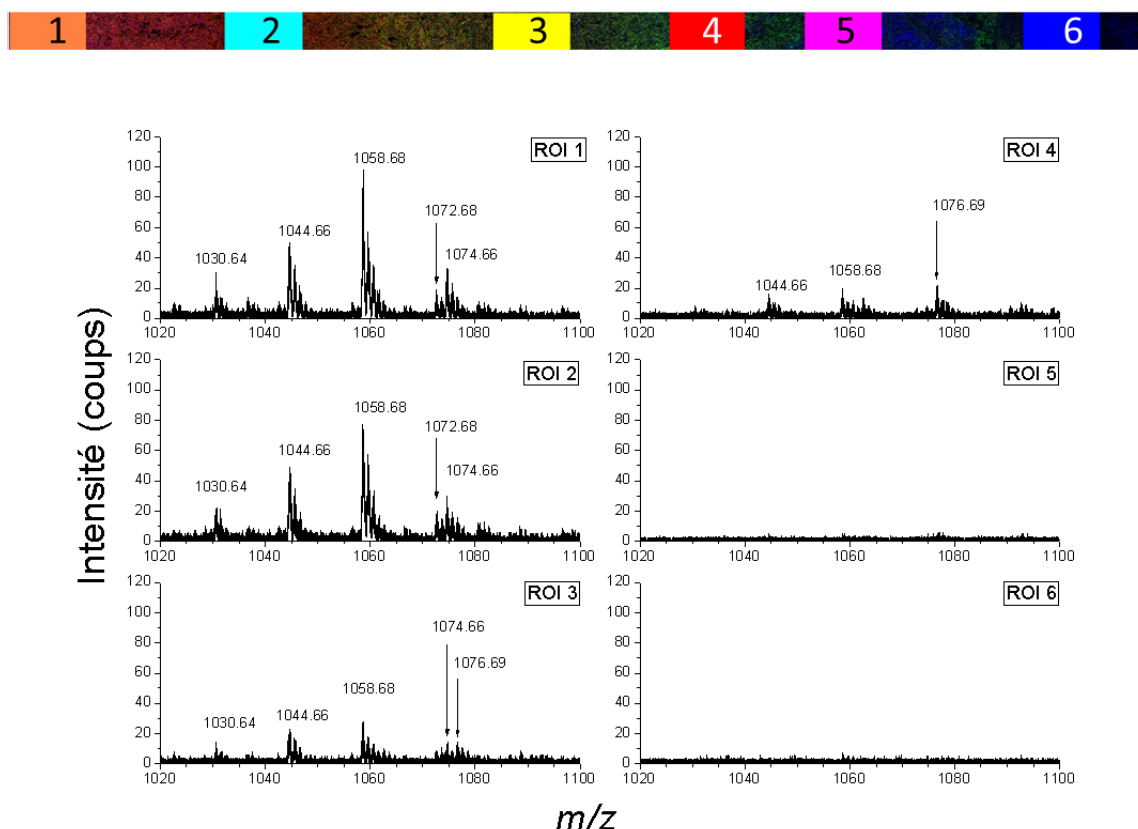


Figure 29 : Superposition deux couleurs des cartes de densité ionique (TOF-SIMS mode positif) en rouge Surfactine C15 $[M+Na]^+ C_{53}H_{93}N_7NaO_{13}^+ m/z 1058,7$ et en vert Surfactine C15 hydrolysée $[M+Na]^+ C_{53}H_{95}N_7NaO_{14}^+ m/z 1076,7$ sur laquelle sont présentées les ROIs qui ont été dessinées. Spectres de masse correspondants à ces ROIs.

La Figure 29 présente la zone où ont été dessinées des ROIs sur l'image obtenue en mode positif. Sur les spectres, observe la même diminution dans le rapport entre les intensités des pics de la surfactine C15 native et de la surfactine C15 hydrolysée, correspondant

respectivement aux pics à m/z 1058,7 et 1076,7. Les résultats sont les mêmes qu'en mode négatif, la surfactine C15 n'est détectée que sous forme hydrolysée à l'approche du champignon, jusqu'à ne plus être détectée.

V.4. Conclusion et perspectives

Récemment, des travaux dirigés par Marc Ongena et Edwin De Pauw ont produit un nombre conséquent de publications sur l'étude des micro-organismes impliqués dans la défense des plantes au niveau de la rhizosphère [33,37,38,39,40]. Pour cela, les outils d'imagerie par spectrométrie de masse ont été utilisés. Cependant, l'étude des endophytes est inédite et apporte des informations sur le rôle de ces derniers dans la défense des végétaux. Cette technique a permis de détecter rapidement les substances sécrétées par *B. subtilis*. La surfactine a un rôle dans la formation de *B. subtilis* en biofilm et permet aussi d'inhiber les souches concurrentes. Il a aussi été montré que ce lipopeptide est hydrolysé par *P. variable*. La plipastatine a aussi été détectée mais son rôle dans la compétition n'est pas expliqué. De plus, la mesure de la masse exacte n'est pas suffisante pour attribuer les structures des surfactines et des plipastatines. Actuellement, des analyses MS/MS de ces ions sont prévues pour vérifier la séquence en acides aminés des surfactines et des plipastatines. Malheureusement, les métabolites exprimés par *P. variable* et précédemment isolés puis caractérisés par LC-MS au Muséum National d'Histoire Naturelle n'ont pas été détectés par les techniques d'imagerie par spectrométrie de masse. Il est alors envisageable de commencer une étude méthodologique pour améliorer la sensibilité de la technique. Il est prévu de tester différents milieux de culture ayant différentes compositions en sels et en composés organiques pour diminuer les effets matrices potentiellement induits par ces derniers. Il serait aussi possible d'utiliser la technique LESA pour *liquid extraction surface analysis* qui permet de bénéficier de la sensibilité de l'électro-ébulisage (ESI). Cette technique a déjà été appliquée à l'analyse d'une souche ayant crû sur gélose et a permis d'étudier les protéines exprimées sous différentes conditions [41]. Fonctionnant à pression atmosphérique, la technique LESA permettrait d'extraire les métabolites produits dans la zone de compétition, de gagner en sensibilité et éventuellement d'étudier l'évolution de ces métabolites dans le temps. Une autre perspective serait de faire croître les souches *in vivo* et de vérifier si le modèle construit sur des souches ayant crû *in vitro* est validé. En effet, il a été montré dans ce travail que l'imagerie TOF-SIMS permettait d'étudier la distribution spatiale des surfactines produites par *B. subtilis*. Cette technique permettant d'obtenir une résolution spatiale comprise entre 200 et 400 nm serait appropriée pour étudier les interactions entre l'hôte, le pathogène et le végétal.

V.5. Références

- [1] Chandra, S.; Morrison, G. H.; Wolcott, C., "Imaging intracellular elemental distribution and ion fluxes in cultured cells using ion microscopy: a freeze-fracture methodology" *Journal of Microscopy* **1986**, 144, 15-37.
- [2] Colliver, T. L.; Brummel, C. L.; Pacholski, M. L.; Swanek, F. D.; Ewing, A. G.; Winograd, N., "Atomic and Molecular Imaging at the Single-Cell Level with TOF-SIMS" *Analytical Chemistry* **1997**, 69, 2225-2231.
- [3] Cliff, J. B.; Gaspar, D. J.; Bottomley, P. J.; Myrold, D. D. "Exploration of Inorganic C and N Assimilation by Soil Microbes with Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry" *Applied and Environmental Microbiology* **2002**, 68, 4067-4073.
- [4] Ostrowski, S. G.; Van Bell, C. T.; Winograd, N.; Ewing, A. G. "Mass Spectrometric Imaging of Highly Curved Membranes During *Tetrahymena* Mating" *Science* **2004**, 305, 71-73.
- [5] Slodzian, G.; Daigne, B.; Girard, F.; Boust, F.; Hillion, F. "Scanning secondary ion analytical microscopy with parallel detection" *Biology of the Cell* **1992**, 74, 43-50.
- [6] Ghosal, S.; Fallon, S. J.; Leighton, T. J.; Wheeler, K. E.; Kristo, M. J.; Hutcheon, I. D.; Weber, P. K. "Imaging and 3D Elemental Characterization of Intact Bacterial Spores by High-Resolution Secondary Ion Mass Spectrometry" *Analytical Chemistry* **2008**, 80, 5986-5992.
- [7] Slaveykova, V. I.; Guignard, C.; Eybe, T.; Migeon, H.-N.; Hoffmann, L. "Dynamic NanoSIMS ion imaging of unicellular freshwater algae exposed to copper" *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, 393, 583-589.
- [8] Thiel, V.; Heim, C.; Arp, G.; Hahmann, U.; Sjövall, P.; Lausmaa, J., "Biomarkers at the microscopic range: ToF-SIMS molecular imaging of Archaea-derived lipids in a microbial mat" *Geobiology* **2007**, 5, 413-421.
- [9] Leefmann, T.; Heim, C.; Siljeström, S.; Blumenberg, M.; Sjövall, P.; Thiel, V. "Spectral characterization of ten cyclic lipids using time-of-flight secondary ion mass spectrometry" *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2013**, 27, 565-581.
- [10] Leefmann, T.; Heim, C.; Kryvenda, A.; Siljeström, S.; Sjövall, P.; Thiel, V. "Biomarker imaging of single diatom cells in a microbial mat using time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS)" *Organic Geochemistry* **2013**, 57, 23-33.
- [11] Debois, D.; Hamze, K.; Guérineau, V.; Le Caër, J.-P.; Holland, I. B.; Lopes, P.; Ouazzani, J.; Séror, S. J.; Brunelle, A.; Laprévote, O. "In situ localisation and quantification of surfactins in a *Bacillus subtilis* swarming community by imaging mass spectrometry" *Proteomics* **2008**, 8, 3682-3691.
- [12] Debois, D. "Imagerie Moléculaire d'échantillons biologiques par spectrométrie de masse ToF-SIMS" *Thèse de doctorat, Université d'Évry Val d'Essonne*, **Octobre 2008**. <http://www.biblio.univ-evry.fr/theses/2008/2008EVRY0014.pdf>.
- [13] Yang, Y.-L.; Xu, Y.; Straight, P.; Dorrestein, P. C. "Translating metabolic exchange with imaging mass spectrometry" *Nature Chemical Biology* **2009**, 5, 885-887.
- [14] Liu, W.-T.; Kersten, R. D.; Yang, Y.-L.; Moore, B. S.; Dorrestein, P. C. "Imaging Mass Spectrometry and Genome Mining via Short Sequence Tagging Identified the Anti-Infective Agent Arylomycin in *Streptomyces roseosporus*" *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133, 18010-18013.
- [15] Gonzalez, D. J.; Xu, Y.; Yang, Y.-L.; Esquenazi, E.; Liu, W.-T.; Edlund, A.; Duong, T.; Du, Liangcheng, Molnár, I.; Gerwick, W. H.; Jensen, P. R.; Fischbach, M.; Liaw, C.-C.; Straigh, P.; Nizet, V.; Dorrestein, P. C. "Observing the invisible through imaging mass spectrometry, a window into the metabolic exchange patterns of microbes" *Journal of Proteomics* **2012**, 75, 5069-5076.
- [16] Barger, S. R.; Hoefler, B. C.; Cubillos-Ruiz, A.; Russel, W. K.; Russell, D. H.; Staight, P. D. "Imaging secondary metabolism of *Streptomyces* sp. Mgl during cellular lysis and colony degradation of cometting *Bacillus subtilis*" *Antonie van Leeuwenhoek*, **2012**, 102, 435-445.
- [17] Liu, W.-T.; Yang, Y.-L.; Xu, Y.; Lamsa, A.; Haste, N. M.; Yang, J. Y.; Ng, J.; Gonzalez, D.; Ellermeier, C. D.; Straight, P. D.; Pevzner, P. A.; Pogliano, J.; Nizet, V.; Pogliano, K.; Dorrestein, P. C. "Imaging mass spectrometry of intraspecies metabolic exchange revealed the cannibalistic factors of *Bacillus subtilis*" *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **2010**, 107, 16286-16290.
- [18] Hoefler, B. C.; Gorzelnik, K. V.; Yang, J. Y.; Hendricks, N.; Dorrestein, P. C.; Straight, P. D. "Enzymatic resistance to the lipopeptide surfactine as identified through imaging mass spectrometry of bacterial competition" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, 109, 13082-13087.
- [19] Moree, W. J.; Phelan, V. V.; Wu, C.-H.; Bandeira, N.; Cornett, D. S.; Duggan, B. M.; Dorrestein, P. C. "Interkingdom metabolic transformations captured by microbial imaging mass spectrometry" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**, 109, 13811-13816.
- [20] Debois, D.; Ongena, M.; Cawoy, H.; De Pauw, E. "MALDI-FTICR MS Imaging as a Powerful Tool to Identify *Paenibacillus* Antibiotics Involved in the Inhibition of Plant Pathogens" *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2013**, 24, 1202-1213.
- [21] Watrous, J. D. Phelan, V. V.; Hsu, C.-C.; Moree, W. J.; Duggan, B. M.; Alexandrov, T.; Dorrestein, P. C. "Microbial metabolic exchange in 3D" *ISME Journal* **2013**, 7, 770-780.

-
- [22] Watrous, J.; Hendricks, N.; Meehan, M.; Dorrestein, P. C. "Capturing Bacterial Metabolic Exchange Using Thin Film Desorption Electrospray Ionization-Imaging Mass Spectrometry" *Anal. Chem.* **2010**, 82, 1598-1600.
- [23] Watrous, J.; Roach, P.; Heath, B.; Alexandrov, T.; Laskin, J.; Dorrestein, P. C. "Metabolic Profiling Directly from the Petri Dish Using Nanospray Desorption Electrospray Ionization Imaging Mass Spectrometry" *Analytical Chemistry* **2013**, 85, 10385-10391.
- [24] Scäfer, K.-C.; Dénes, J.; Albrecht, K.; Szaniszló, T.; Balog, J.; Skoumal, R.; Katona, M.; Tóth, M.; Balogh, L.; Takáts, Z. "In Vivo, In Situ Tissue Analysis Using Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry" *Angewandte Chemie, International Edition* **2009**, 48, 8240-8242.
- [25] Golf, O.; Strittmatter, N.; Karancsi, T.; Pringle, S. D.; Speller, A. V. M.; Mroz, A.; Kinross, J. M.; Abbassi-Ghadi, N.; Jones, E. A.; Takats, Z. "Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry Imaging Platform for Direct Mapping from Bulk Tissue and Bacterial Growth Media" *Analytical Chemistry* **2015**, 87, 2527-2534.
- [26] Prado, S.; Li, Y.; Nay, B. "Diversity and Ecological Significance of Fungal Endophyte Natural Products" in *Studies in Natural Product Chemistry*, **2012**, 36, chapter 8, 249-296.
- [27] Krings, M.; Taylor, T. N.; Hass, H.; Kerp, H.; Dotzler, N.; Hermsen, E. J. "Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses" *New Phytologist* **2007**, 174, 948-957.
- [28] Clay, K. "Fungal Endophytes of Grasses: A defensive Mutualism between Plants and Fungi" *Ecology* **1988**, 69, 10-16.
- [29] Stierle, A.; Strobel, G.; Donald S. "Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreanae*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew" *Science* **1993**, 260, 214-216.
- [30] Rodriguez, R. J.; White Jr, J. F.; Arnold, A. E.; Redman, R. S. "Fungal endophytes: diversity and functional roles" *New Phytologist* **2009**, 182, 314-330.
- [31] Touboul, D.; Roy, S.; Germain, D. P.; Chaminade, P.; Brunelle, A.; Laprévote, O. "MALDI-TOF and cluster-TOF-SIMS imaging of Fabry disease biomarkers" *International Journal of Mass Spectrometry* **2007**, 260, 158-165.
- [32] Yang, Y. Y.; Phelan, V. V.; Simkovsky, R.; Watrous, J. D.; Trial, R. M.; Fleming, T. C.; Wenter, R.; Moore, B. S.; Golden, S. S.; Pogliano, K.; Dorrestein, P. C. "Primer on Agar-Based Microbial Imaging Mass Spectrometry" *Journal of Bacteriology* **2012**, 194, 6023-6028.
- [33] Debois, D.; Ongena, M.; Cawoy, H.; De Pauw, E. "MALDI-FTICR MS Imaging as a Powerful Tool to Identify Paenibacillus Antibiotics Involved in the Inhibition of Plant Pathogens" *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2013**, 24, 1202-1213.
- [34] Kadar, H.; Le Douaron, G.; Amar, M.; Ferrié, L.; Figadère, B.; Touboul, D.; Brunelle, A.; Raisman-Vozari, R. "MALDI Mass Spectrometry Imaging of 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) in Mouse Brain" *Neurotoxicity Research* **2014**, 25, 135-145.
- [35] Deininger, S.-O.; Cornett, D.S.; Paape, R.; Becker, M.; Pineau, C.; Rauser, S.; Walch, A.; Wolski, E. "Normalization in MALDI-TOF imaging datasets of proteins practical considerations" *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, 401, 167-181.
- [36] Karas, M.; Hillenkamp, F. "Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10,000 Daltons" *Analytical Chemistry* **1988**, 60, 2299-2301.
- [37] Nihorimbere, V.; Cawoy, H.; Seyer, A.; Brunelle, A.; Thonart, P.; Ongena, M. "Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant beneficial strain *Bacillus amyloquelaciens* S499" *FEMS Microbiology Ecology* **2012**, 79, 176-191.
- [38] Debois, D.; Jourdan, E.; Smargiasso, N.; Thonart, P.; De Pauw, E.; Ongena, M. "Spatiotemporal Monitoring of the Antibiotic Secreted by *Bacillus* Biofilms on Plant Roots Using MALDI Mass Spectrometry Imaging" *Analytical Chemistry* **2014**, 86, 4431-4438.
- [39] Cawoy, H.; Debois, D.; Franzil, L.; De Pauw, E.; Thonart, P.; Ongena, M. "Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloquelaciens*" *Microbial Biotechnology* **2014**, 8, 281-295.
- [40] Debois, D.; Fernandez, O.; Franzil, L.; Jourdan, E.; de Brogniez, A.; Willems, L.; Clément, C.; Dorey, S.; De Pauw, E.; Ongena, M. "Plant polysaccharides initiate underground cross talk with bacilli by inducing synthesis of the immunogenic lipopeptide surfactin" *Environmental Microbiology Reports* **2015** In press doi: 10.1111/1758-2229.12286
- [41] Randall, E. C.; Bunch, J.; Cooper, H. J. "Direct Analysis of Intact Proteins from *Escherichia coli* Colonies by Liquid Extraction Surface Analysis Mass Spectrometry" *Analytical Chemistry* **2014**, 86, 10504-10510.

Conclusion générale

VI Conclusion générale

Le projet initial de cette thèse avait pour but d'étudier la duraminisation de bois tropicaux à l'aide de l'imagerie par spectrométrie de masse. Nous avons très rapidement rencontré d'importantes difficultés dans la préparation des échantillons. Le bois étant un matériau complexe structuré en trois-dimensions, il a d'abord fallu se familiariser avec l'histologie et la composition chimique du bois, ainsi qu'avec les méthodes pour obtenir une surface rigoureusement plane. D'autres projets ont été entrepris parallèlement à celui-ci, et seulement certains d'entre eux ont été développés dans ce manuscrit.

En collaboration avec Julie Croué, doctorante dans l'équipe de Bernard Banaigs, et Nataly Bontemps j'ai tenté d'étudier la distribution spatiale d'alcaloïdes extraits d'éponges marines de l'espèce *Crambe crambe*. Après avoir été effectué une étude de faisabilité sur un extrait de cette espèce, le projet semblait prometteur. Malheureusement, lorsque nous avons souhaité commencer à étudier la distribution des alcaloïdes à la surface de coupes d'éponge, nous avons été confrontés là aussi à un problème de préparation d'échantillon. L'éponge *Crambe crambe* étant un organisme doté d'un squelette constitué de spicules, il nous a été impossible de couper l'échantillon avec une lame en acier inoxydable. Les spicules présentes dans le tissu étant déplacées à chaque mouvement la lame, les coupes obtenues présentaient systématiquement des déchirures importantes. Nous avons tenté d'utiliser des techniques d'enrobage, ce qui a permis d'obtenir des coupes de meilleure qualité, mais a aussi induit une délocalisation des métabolites.

Un autre projet consistait à étudier les interactions entre deux microorganismes, respectivement un champignon endophyte et une bactérie pathogène. Cette étude a montré qu'il était possible d'utiliser l'imagerie par spectrométrie de masse pour détecter les métabolites mis en jeu lors de compétitions microbiennes, comme cela avait déjà été effectué par l'équipe de Pieter C. Dorrestein à l'aide de sources MALDI, DESI et nano-DESI. L'originalité de ce travail est d'avoir réussi à trouver une méthode de préparation d'échantillon permettant d'étudier la communication chimique entre deux microorganismes à l'aide d'un TOF-SIMS.

Nous nous sommes ensuite intéressés à caractériser l'extraction retardée, pour obtenir en imagerie TOF-SIMS à la fois une bonne résolution spatiale et une bonne résolution en masse. Ce projet m'a permis de renforcer mes connaissances sur le TOF-SIMS ainsi que sur la théorie associée à cette technique. Cette méthode a été appliquée dans nos études sur les métabolites de bois tropicaux, et a aussi été utilisée par une de mes collègues qui a étudié des prélèvements de tableaux anciens.

Après avoir testé plusieurs méthodes différentes pour obtenir des coupes histologiques de bois, la meilleure méthode a été d'utiliser un ultramicrotome équipé d'un couteau de diamant. Cela a permis d'obtenir des surfaces transversales de bois analysables en imagerie par spectrométrie de masse. Il m'a alors été possible d'analyser différentes surfaces de *Dicorynia guianensis* et de mesurer à l'échelle cellulaire la distribution spatiale de certains

Conclusion générale

métabolites secondaires. À l'aide de cette préparation d'échantillon, le TOF-SIMS a permis de caractériser simultanément trois voies de défense utilisées par cette espèce contre ses nuisibles. La première d'entre elles est la production de métabolites secondaires au niveau de la zone de transition. Avant de subir leur apoptose, les cellules de parenchyme qui se trouvent dans cette zone produisent de la tryptamine. Celle-ci est se diffuse ensuite dans les parois de toutes les cellules, augmentant ainsi leur toxicité. Il a ensuite été constaté une disparition des grains d'amidon, et une diminution de la quantité de composés inorganiques dans les parties les plus âgées du bois. Ceci permettrait à l'arbre de recycler les éléments indispensables à son développement, tout en devenant moins nutritif, donc moins attractif pour des insectes et microorganismes souhaitant s'en nourrir. Pour finir, des structures composées de silice ont été détectées dans toutes les parties de ce bois. Bien que cela nécessite d'être vérifié, il serait possible que ces structures aient pour but d'endommager les mandibules d'insectes xylophages, limitant les dégâts qu'ils peuvent induire.

Aujourd'hui, nous souhaitons terminer nos projets sur l'étude d'éponge marine, en s'inspirant de notre méthode de préparation d'échantillons de surface de bois à l'aide d'un ultramicrotome, d'obtenir des surfaces analysables en imagerie par spectrométrie de masse et sans délocalisation des métabolites. Nous souhaitons aussi achever le projet sur les microorganismes en terminant les expériences de spectrométrie de masse en tandem qui n'ont pas pu être présentées dans ce manuscrit. En effet, nous avons rencontré des problèmes de contamination des colonies qui ont plusieurs fois reporté ces expériences.

Après trois ans de travail sur l'imagerie par spectrométrie de masse, je suis tout à fait convaincu par l'intérêt de cette technique. De nombreux sujets sont encore à concevoir ou à développer. Je suis de plus en plus intéressé par l'analyse de cellules uniques, ainsi que par celle d'échantillons archéologiques ou plus généralement du patrimoine culturel.

VII Liste des illustrations

II. Introduction

Figures :

Figure 1 : Schéma (a) et photographie (b) de l'instrument basé sur la microanalyse par émission ionique secondaire construit par Castaing et Slodzian [6].	7
Figure 2 : Images ioniques de coupes de reins de lapin (a) et d'un dépôt de globule rouge humain (b) [7].	8
Figure 3 : Schéma simplifié du principe de la pulvérisation [15].	9
Figure 4 : Schéma illustrant l'influence du rendement d'émission ionique secondaire Y et de la section efficace d'endommagement σ sur l'efficacité [15].	11
Figure 5 : Schéma de différents modèles de pulvérisation : Modèle du recul direct (a) Modèle de cascade linéaire (b) Modèle de pointe thermique [16].	12
Figure 6 : Dissociation d'une paire d'ions.	13
Figure 7 : Principe du modèle moléculaire. Les ions sont formés en phase gazeuse après dissociation d'un complexe métal oxyde neutre.	14
Figure 8 : Réactions mise en jeu (a) et schéma du principe (b) du modèle de désorption ionisation [21].	15
Figure 9 : Rendement d'émission ionique secondaire de l'ion moléculaire de phénylalanine $[M-H]^+$ à m/z 164,2 en fonction de l'énergie cinétique par unité de masse des ions primaires. Les ions primaires sont des agrégats d'or de type Au_n^{q+} avec $n=1$ à 5 et $q=1$ ou 2 [27].	16
Figure 10 : Images TOF-SIMS en bordure d'un corps calleux d'une coupe de cerveau de rat en mode d'ionisation positif. Chaque ligne correspond à une sélection différente des ions primaires et chaque colonne à un ion de masse-sur-charge différente [28].	17
Figure 11 : Vues transversale et radiale d'un cratère sur une surface d'argent après impact d'un agrégat d' Au_3 , C_{60} , et Ar_{872} accéléré à 20 keV. Les résultats proviennent de simulations informatiques, les couleurs permettent de localiser les atomes provenant d'une couche donnée [35].	18
Figure 12 : Rendement d'émission secondaire d'ions moléculaires de phénylalanine et de d'une monocouche de Langmuire-Blodgett pour des projectiles d' Au_4^+ et de C_{60}^+ à différentes énergies [29].	18
Figure 13 : Reconstruction en trois dimensions de la distribution de trois ions d'une surface analysée en <i>dual beam depth profiling</i> [45].	19
Figure 14 : Schéma du spectromètre de masse construit par Honig et Woolston [51].	21
Figure 15 : Schéma décrivant le <i>cluster model</i> [64].	22
Figure 16 : Schéma de l'analyseur en masse construit par Stephens [70].	23
Figure 17 : Schéma de principe de l'analyseur par temps de vol linéaire.	24
Figure 18 : Représentation schématisée de l'extraction retardée.	26
Figure 19 : Schéma simplifié d'un miroir électrostatique. Les courbes rouges et bleu représentent le parcours de deux ions au même m/z mais ayant des énergies cinétiques différentes.	27

Figure 20 : A. Schéma représentant une galette de microcanaux. B. Deux types de montage : canaux simples et assemblage en chevrons.	29
Figure 21 : Rendement d'émission électronique en fonction de l'énergie par unité de masse ou de la vitesse du C ₆₀ , L.H.R.H., de l'insuline humaine, d'une trypsine bovine et du l'albumine de sérum bovin sur une surface de CsI [76].	30
Figure 22 : Principe d'un détecteur multiplicateur d'électron [77].	30
Figure 23 : Résultats de l'analyse d'un échantillon prélevé du tableau représentant le portrait de Nicolaes Van Bambeeck peint par Rembrandt van Rijn. a) Image optique de l'échantillon prélevé b) Image optique de l'échantillon exposé aux ultra-violets c) Superposition de plusieurs images montrant la localisation des différentes couches constituant l'échantillon [87].	32
Figure 24 : Photographie et schéma du TOF-SIMS IV (photographie Copyright A. Brunelle et schéma Copyright Ion-TOF GmbH).	33
Figure 25 : Schéma d'une source à pointe liquide [94].	34
Figure 26 : Schéma d'un double système pulsation/sélection [94].	35
Figure 27 : Schéma d'une aberration chromatique due à des ions ayant des énergies cinétiques différentes.	35
Figure 28 : Densité de courant d'électrons ou fluence en fonction de la densité d'ions primaires ou de la surface bombardée par le faisceau d'ions primaires ayant un courant de 1 pA pendant 100 s [95].	36
Figure 29 : Schéma de l'analyseur à temps de vol équipant le spectromètre de masse TOF-SIMS IV (Cette figure provient des fichiers d'aide du logiciel du constructeur).	37
Figure 30 : Exemples de spectres de masse obtenus respectivement avec les modes HCBU (a), BA (b) et Burst (c) [96].	39
Figure 31 : Premières images MALDI. Distribution du potassium sur un dépôt d'erythrocytes (a) et image ionique de la protéine IB-1 à m/z 7605 provenant de muqueuse buccale de humaine (b) [97,98,99].	40
Figure 32 : Image d'une coupe de cerveau de rat (a). Spectre de masse MALDI de section de cerveau de rat à différentes épaisseurs 2 (b), 5 (c), 10 (d), 15 (e), 30 (f) et 40 μm (g).	42
Figure 33 : Schéma du système d'extraction des ions à l'entrée de l'analyseur TOF équipant le spectromètre de masse UltrafleXtreme TM . Ce schéma provient de la notice d'utilisation de l' UltrafleXtreme TM	43
Figure 34 : Schéma du système LIFT. Ce schéma provient de la notice d'utilisation de l'UltrafleXtreme TM	44
Figure 35 : Schéma de l'organisation des données d'une acquisition TOF-SIMS. Cette figure provient des fichiers d'aide du logiciel du constructeur.	45
Figure 36 : Exemple d'une image reconstruite avec <i>Measurement Explorer – Images</i>	46

III. Méthodologie en imagerie TOF-SIMS

Figures:

Figure 1 : Mesure du courant du faisceau de Bi₃⁺ en fonction du temps d'ouverture de la seconde plaque du système de pulsation/sélection. Les barres d'erreur sont inférieures ou

égales à la taille des points. La droite est une régression linéaire pour guider la lecture, et pour laquelle les 3 premiers points expérimentaux n'ont pas été pris en compte.....	60
Figure 2 : a) Principe de la mesure du diamètre du faisceau selon la méthode <i>knife edge</i> b) Exemple de mesure de diamètre de faisceau c) Intensité en fonction de la position sur la grille. La distance entre $I_{\max}(16\%)$ et $I_{\max}(84\%)$ correspond au diamètre du faisceau.	61
Figure 3 : Résolution spatiale en fonction de l'intensité en Bi_3^+	62
Figure 4 : Comparaison entre deux images enregistrées avec des différentes intensités de Bi_3^+ de a) 0,17 pA et de b) 0,32 pA.	63
Figure 5 : Images ioniques de l'ion $[\text{C}_{18}:0\text{-H}]^-$ à m/z 283,3 reconstruites pour différentes doses de a) $5 \times 10^{11} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ et de b) $2 \times 10^{12} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$	65
Figure 6 : Intensité en coups des pics des ions $[\text{C}_{18}:0\text{-H}]^-$ à m/z 283,3 et du cholestérol $[\text{M-H}]^-$ à m/z 385,4 en fonction de la dose d'ions primaires en $\text{ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ (échelle du bas) et du temps en seconde (échelle du haut). Les profils ont été tracés pour une ROI dans la matière blanche (voir Figure 5). Les lignes pleines et pointillées permettent de guider les yeux.	65
Figure 7 : Simulation de la trajectoire des ions secondaires produit depuis un fil d'or d'une épaisseur de 125 μm et de la surface supportant le fil d'or a) sans extraction retardée b) avec extraction retardée, d'après la référence 45.	67
Figure 8 : Temps de vol de l'ion Au^+ pour des valeurs d'extraction retardée de 0 ns (rouge) ; 30 ns (orange) ; 50 ns (vert) ; 70 ns (en bleu) et 90 ns (en violet), d'après la référence 45. ...	67
Figure 9 : Optimisation de l'extraction retardée en mode BA. a) résolution en masse des ions $[\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}_2]^-$ (m/z 255,2) et $[\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{O}]^-$ (m/z 385,4) en fonction de l'extraction retardée b) largeur des pics à mi-hauteur pour les ions $[\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}_2]^-$ (m/z 255,2) et $[\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{O}]^-$ (m/z 385,4) en fonction de l'extraction retardée c) nombre de coups total en fonction de l'extraction retardée en mode négatif d) résolution en masse des ions $[\text{C}_{27}\text{H}_{45}]^+$ (m/z 369,4) et $[\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2]^{++}$ (m/z 430,4) en fonction de l'extraction retardée e) largeur des pics à mi-hauteur pour les ions $[\text{C}_{27}\text{H}_{45}]^+$ (m/z 369,4) et $[\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2]^{++}$ (m/z 430,4) f) nombre de coups total en fonction de l'extraction retardée en mode positif. Les droites verticales vertes indiquent la valeur optimale de 1235 ns de l'extraction retardée.	69
Figure 10 : Superposition de quatre parties de spectres montrant le pic du cholestérol déprotoné à m/z 385,4 obtenus à différentes valeurs d'extraction retardée.	70
Figure 11 : Calcul des temps de vol d'ions m/z 400 ayant différentes valeurs d'énergie cinétique initiale (0,1 ; 0,2 ; 0,5 ; 1,0 eV). La durée d'émission des ions est de 100 ns. La calcul a été réalisé pour des valeurs d'extraction retardée égales à 50 ns en noir, 100 ns en rouge, 150 ns en vert, et 200 ns en bleu. Les flèches verticales indiquent pour une extraction retardée de 200 ns les groupes d'ions ayant des énergies cinétiques initiales de 0,2 ; 0,5 et 1,0 eV respectivement.	72
Figure 12 : Détermination du décalage de la valeur d'extraction retardée pour un TOF-SIMS IV a) Portions de spectre de masse montrant le pic de l'ion H^- à différentes valeurs d'extraction retardée. La ligne verticale rouge en trait mixte fin permet de mieux voir lorsque le pic est décalé. b) Valeurs d'extraction retardée optimales pour différentes durées d'impulsion des ions primaires. Dans l'équation de la régression linéaire, X représente la durée d'impulsion des ions primaires et Y la valeur de l'extraction retardée. R est le coefficient de linéarité.	73

Figure 13 : Simulation SIMION montrant la position des ions secondaires (m/z 400) sur la surface de la galette de microcanaux calculée en fonction de l'énergie cinétique initiale des ions à 0,1 eV (en rouge) ; 0,2 eV (en bleu) ; 0,5 eV (en orange) et à 1,0 eV (en vert).....	74
Figure 14 : Position moyenne des ions sur l'axe X de la galette de microcanaux (MCP) en fonction du rapport masse-sur-charge des ions secondaires m/z 1 ; 6 ; 12 ; 14 ; 23 ; 48 et 100.	75
Figure 15 : a, b et c) parties de spectres de masse en mode négatif des images enregistrées sur une section sagittale de cervelet de rat montrant des pics d'acides gras pour les modes HCBU, BA et BA+DE. d, e et f) mêmes spectres montrant des pics de sulfatides pour les modes HCBU, BA et BA+DE.....	77
Figure 16 : a, b et c) parties de spectres de masse en mode positif des images enregistrées sur une section sagittale de cervelet de rat montrant des pics du cholestérol pour les modes HCBU, BA et BA+DE. d, e et f) mêmes spectres montrant le massif de la vitamine E pour les modes HCBU, BA et BA+DE.	77
Figure 17 : Superposition trois couleurs d'images ioniques TOF-SIMS enregistrées sur des surfaces de section sagittale de cervelet de rat en mode négatif. Les images ioniques correspondent à $[C18:0-H]^-$ m/z 283,3 (en rouge), $[C16:0-H]^-$ m/z 255,2 (en vert), et cholestérol $[M-H]^-$ m/z 385,4 (en bleu). Les images a à c correspondent aux acquisitions obtenues en mode HCBU, BA et BA+DE respectivement. Les images d à f correspondent à un zoom de $100\ \mu m \times 100\ \mu m$ des images a à c. Les flèches blanches montrent les cellules de Purkinje. L'image en mode HCBU a été rognée pour être directement comparée aux autres images.	78

Tableaux :

Tableau 1 : Mesure du courant et du diamètre du faisceau pour différentes durées d'impulsion de Bi_3^+ en mode BA.....	62
Tableau 2 : Courant mesuré, taille du faisceau de Bi_3^+ , résolution en masse de l'ion $[C_{27}H_{45}]^+$ à m/z 369,4 et de l'ion $[C_{27}H_{45}O]^+$ à m/z 385,4 et la largeur à mi-hauteur du pic en fonction de la valeur de la durée d'ouverture de la seconde plaque du système pulsation/sélection (ns) (ΔM est la largeur du pic à mi-hauteur). * À différents allumages de l'émetteur de bismuth.	64
Tableau 3 : Résolution en masse, diamètre de faisceau de Bi_3^+ , valeur du retard d'extraction et courant de Bi_3^+ pour les modes HCBU, BA et BA+DE.	71
Tableau 4 : Paramètres pour les différents modes d'acquisition utilisés pour l'imagerie TOF-SIMS de sections sagittales de cervelet de rat.	76

IV. Application de l'imagerie par spectrométrie de masse aux substances naturelles 1ère partie : Étude de la duraminisation d'une espèce tropicale

Figures :

Figure 1 : Schéma des différents constituants d'une paroi végétale.....	86
Figure 2 : Images MEB illustrant les ponctuations permettant l'échange intercellulaire a) Ponctuations sur une coupe de bois. b et c) coupe d'une paire de ponctuations. c à d)	

différents type de ponctuation c) ponctuation simple d) ponctuation alvéolée présentant un torus e) ponctuation semi-alvéolée [4].	87
Figure 3 : Représentation schématique des différentes parties anatomiques du bois.	88
Figure 4 : Images en microscopie électronique à balayage (MEB) de surfaces transversales de bois. a) Bois homoxylé, épinette de Sitka <i>Picea sitchensis</i> b) Bois hétéroxylé, chêne rouge <i>Quercus spp.</i> [4].	90
Figure 5 : Schéma des différents types d'épaississement des vaisseaux [1].	91
Figure 6 : Les différentes distributions des cellules de parenchymes axiales à travers différentes coupes de bois. A) distribution vasicentrique, B) distribution en agrégats diffus C) distribution aliforme D) distribution en bande E) distribution confluyente F) distribution marginale. A,C et E présentent des parenchymes paratrachéaux B, D et F présentent des parenchymes apotrachéaux [4].	92
Figure 7 : Schéma des trois types de coupes pouvant être obtenus sur une tige.	93
Figure 8 : Schéma d'une coupe transversale I), d'une coupe radiale II), et d'une coupe tangentielle III) Description dans le texte [4].	94
Figure 9 : Structure de la cellulose [3,16].	96
Figure 10 : a) structure des trois monomères de la lignine b) Modèle de la structure de la lignine de l'épinette proposé par Feudenberg [18].	97
Figure 11 : Gauche : la structure de l'amylose ; Droite : la structure de l'amylopectine.	98
Figure 12 : Structure de la pectine [21].	98
Figure 13 : Structure de la pinosylvine.	99
Figure 14 : Structure de l'hinokitiol.	100
Figure 15 : De gauche à droite, les structures du rubrynolide et du rubrérolide.	100
Figure 16 : Liste des formules brutes des fragments de lignine obtenus en TOF-SIMS [31,35].	101
Figure 17 : Intensités des ions fragments caractéristiques de la lignine type G (a) et de type S (b) et rapport des intensités Lignine G/S (c) en fonction de la distance. Superposition deux couleurs des images ioniques correspondant aux ions fragments de la ligne G (en rouge) et de la ligne S (en vert). La ligne blanche représente la zone du balayage de a, b, et c [37].	102
Figure 18 : Structure de quatre alcaloïdes indoliques isolés de <i>D. guianensis</i> . a) Dicorynamine b) N-Acétyletryptamine c) Harmalan-N-oxide d) Cordisinine C	103
Figure 19 : Images au microscope optique de différentes méthodes de préparation de surface de <i>D. guianensis</i> . a) Coupe radiale au microtome. b) Surface tangentielle de <i>D. guianensis</i> poli c) Coupe transversale au microtome après ramollissement dans l'eau d) Surface « rabotée » avec un ultra-microtome équipé d'un couteau de verre e) Surface « rabotée » avec un ultra-microtome équipé d'un couteau de diamant.	106
Figure 20 : Distribution de la somme des ions Ca^+ et CaOH^+ sur une coupe obtenue au microtome après ramollissement du tissu dans de l'eau (a), et pour une surface « rabotée » avec un ultra-microtome équipé d'un couteau de diamant (b).	107
Figure 21 : Photographie de l'échantillon de <i>D. guianensis</i> et des zones découpées pour l'étude.	108
Figure 22 : Montage de l'échantillon a) des rondelles sont mises en place pour reculer l'échantillon afin qu'il ne dépasse pas trop. b) L'échantillon est placé. c) les plaquettes intercalaires en aluminium sont placées à côté de l'échantillon (elles doivent être à la hauteur	

de la base de l'échantillon). d) Une grande plaquette intercalaire en aluminium est utilisée pour maintenir l'échantillon avec des petits ressorts visibles sur les côtés.	109
Figure 23 : Image de coupe radiale de bois. De gauche à droite, le duramen, la zone de transition et l'aubier. Le rectangle noir représente la zone qui a été analysée en mode <i>stage scan</i>	110
Figure 24 : a) Spectres de masse obtenus en mode <i>burst alignment</i> sans et avec extraction retardée. b) superposition trois couleurs des trois images ioniques correspondant aux ions CaOH^+ à m/z 56,97 (en bleu), $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}^+$ à m/z 57,03 (en vert) et C_4H_9^+ à m/z 57,07 (en rouge).	110
Figure 25 : Superposition des spectres de masse enregistrés en mode HCBU (noir) et en mode BA+DE (rouge), tous les deux ayant été étalonnés avec des ions « légers » (liste ci-dessus).	111
Figure 26 : Superposition des spectres de masse enregistrés en mode HCBU (noir) et en mode BA+DE (rouge), tous les deux étalonnés avec des ions « lourds ».	112
Figure 27 : Spectres de masse obtenus sans et avec correction du temps de vol.	113
Figure 28 : Images de la distribution de la somme des ions Ca^+ et CaOH^+ avant et après correction du temps de vol (la correction permet en fait une meilleure sélection des pics). .	114
Figure 29 : Superposition deux couleurs en rouge de la somme des ions fragments de la lignine et en vert de la somme des ions fragments de la cellulose sans (a) ou avec (b) application de la fonction <i>shift correction</i> . La flèche blanche pointe une ponctuation.	115
Figure 30 : Spectre de masse TOF-SIMS d'un standard de tryptamine enregistré en mode positif et formule de la molécule sur laquelle est dessiné le motif de fragmentation en TOF-SIMS.	115
Figure 31 : Images ioniques d'une coupe de <i>D. guianensis</i> obtenues à l'aide d'un microtome a) Na^+ à m/z 22,99 b) K^+ à m/z 38,96 c) somme des ions fragment de la lignine d) ion fragment de la cellulose e) somme des ions fragments de la tryptamine f) superposition deux couleurs du sodium (rouge) et de la somme des ions fragments de la tryptamine (vert).	116
Figure 32 : Superposition deux couleurs de la somme des ions fragments de la lignine (en rouge) et de la somme des ions fragments des polysaccharides (en vert). Les images ioniques proviennent des différentes parties de <i>D. guianensis</i> . a) aubier naissant b) aubier avancé c) zone de transition naissante d) zone de transition avancée e) duramen naissant f) duramen avancé. Les images ont été rognées pour « zoomer » sur une zone de $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ afin de mieux montrer les cellules à proximité d'un vaisseau.	119
Figure 33 : Spectre de masse en mode négatif de la ROI des zones suspectées contenir de l'amidon.	120
Figure 34 : Structure du motif des ions fragments de l'amidon détectés en mode négatif.	120
Figure 35 : Distribution des ions fragments de la tryptamine pour les différentes zones étudiées a) aubier naissant b) aubier avancé c) zone de transition naissante d) zone de transition avancée e) duramen naissant f) duramen avancé. Les images ont été rognées pour « zoomer » sur une zone de $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ afin de mieux montrer les cellules à proximité d'un vaisseau.	122
Figure 36 : Aires normalisées de la somme des ions fragments de la tryptamine et du potassium mesurées pour les différentes zones étudiées a) aubier naissant b) aubier avancé c)	

zone de transition naissante d) zone de transition avancée e) duramen naissant f) duramen avancé.	122
Figure 37 : Distribution des ions du calcium (Ca^+ et CaOH^+) pour les différentes zones étudiées a) aubier naissant b) aubier avancé c) zone de transition naissante d) zone de transition avancée e) duramen naissant f) duramen avancé. Les images ont été rognées pour « zoomer » sur une zone de $200\text{ }\mu\text{m} \times 200\text{ }\mu\text{m}$ afin de mieux montrer les cellules à proximité d'un vaisseau.	123
Figure 38 : Superposition trois couleurs de la somme des ions fragments des polysaccharides (rouge), de la somme des ions fragments des lignines (vert), et du calcium (Ca^+ et CaOH^+ , bleu). a) aubier avancé c) duramen naissant. « scan line » effectués le long du segment blanc en a) et c) de la somme des ions fragments des polysaccharides (rouge), de la somme des ions fragments des lignines (vert) et de la somme des ions du calcium (Ca^+ et CaOH^+ , bleu). Les images ont été rognées pour « zoomer » sur une zone de $200\text{ }\mu\text{m} \times 200\text{ }\mu\text{m}$ afin de mieux montrer les cellules à proximité d'un vaisseau.	124
Figure 39 : Distribution des fragments de la silice (en mode négatif) pour les différentes zones étudiées a) aubier naissant b) aubier avancé c) zone de transition naissante d) zone de transition avancée e) duramen naissant f) duramen avancé.	125
Figure 40 : Spectre de masse en mode négatif de la ROI des structures suspectées d'être de la silice.	125

Tableaux :

Tableau 1 : Résolution et précision en masse mesurées pour les ions CH_3^+ ; CHO^+ ; CaOH^+ ; $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}^+$ et $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_3^+$	112
Tableau 2 : Mesure des erreurs standards en ppm pour les spectres de masse obtenus avec ou sans correction du temps de vol.	113
Tableau 3 : Ions fragments attribués à la lignine et aux polysaccharides d'après Goacher <i>et al.</i> La masse théorique, la masse calculée et la déviation standard en ppm des ions détecté lors des expériences en BA+DE.	118
Tableau 4 : Formule brute, masses théoriques et mesurées et déviation standard en ppm des ions fragments de l'amidon détecté en mode négatif.	121

V. Application de l'imagerie par spectrométrie de masse aux substances naturelles 2ème partie : Imagerie par spectrométrie de masse de micro-organismes

Figures :

Figure 1 : Image ionique d'élément marqués provenant de l'empreinte d'un échantillon de terre permettant l'image de cellule unique. a) Distribution spatiale des ions SiO_2^- en jaune et de la somme de $^{26}\text{CN}^-$ et $^{27}\text{CN}^-$ en bleu sur un échantillon bactérien b) Distribution spatiale des ions $^{26}\text{CN}^-$ en rouge et $^{27}\text{CN}^-$ en vert sur un échantillon bactérien c) Distribution spatiale des ions $^{26}\text{CN}^-$ en rouge et $^{27}\text{CN}^-$ en vert d'un champignon. D'après la référence 3.	133
Figure 2 : Distribution de $^{31}\text{P}^-$ et de $^{63}\text{Cu}^-$ au sein d'une cellule de <i>Chlorella kesslerii</i> . D'après la référence 7.	134

Figure 3 : Répartition des différentes espèces de surfactines à la surface du swarming. a: Image ionique de la somme des ions de surfactines, avec des régions d'intérêt (ROI) délimitées par les contours de couleurs rouge, jaune, verte et bleue. mc représente l'intensité maximale dans l'image, et tc le nombre total de coups. L'échelle de couleur correspond à l'intervalle [0, MC]. b,c,d,e : Spectres de masse partiels obtenus à partir des ROI b : colonie mère (rouge), c : Dendrite (jaune), d : anneau (vert), e : au-delà de la pointe des dendrites (bleu). La ROI délimitée par la zone en magenta ne contenait aucune surfactine détectable [11].	135
Figure 4 : A) Image optique de la compétition entre <i>B. subtilis</i> (souche à gauche) et <i>S. coelicolor</i> (souche à droite). B) Superposition de deux cartes de densité ionique, en rouge la somme des ions caractéristiques de la surfactine, en vert la molécule protonée de SapB. WT = Wild Type, et bacB ⁻ sfp ⁻ est une souche mutante n'exprimant pas de bacillaène, de surfactines ni de plipastatines. D'après la référence 13.	136
Figure 5 : Schéma du protocole proposé pour l'imagerie trois dimensions de compétitions microbiennes. D'après la référence 21.	137
Figure 6 : Structure des deux composés extraits de <i>P. variable</i> a) C ₁₅ H ₂₀ O ₅ b) C ₁₅ H ₁₈ O ₄ ...	138
Figure 7: Formule générale des surfactines.	139
Figure 8 : Images optiques des trois échantillons selon les préparations (a) méthode de dépôt direct (b) méthode de transfert de gélose (c) méthode transfert de papier filtre. L'abréviation BS correspond à <i>B. subtilis</i> et PV à <i>P. variable</i> , la distance entre les souches correspond à la zone de compétition.	140
Figure 9 : (a) Spectre de masse des deux ROI : ROI1 dans la colonie bactérienne et ROI2 en dehors de la colonie bactérienne (zone de compétition), pour la préparation d'échantillon « méthode de dépôt direct » (mode positif) (b) Spectre de masse des deux ROI : ROI1 et ROI2 pour la préparation d'échantillon « méthode de dépôt direct » (mode positif) (c) Image MALDI (mode positif) de l'ion à m/z 1058,7, surfactine cationisée [C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃ +Na] ⁺ pour la préparation d'échantillon « méthode de transfert de la gélose » (d) Image MALDI (mode positif) de l'ion à m/z 1058,7, surfactine cationisée [C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃ +Na] ⁺ pour la préparation d'échantillon « méthode de transfert de la gélose ».	142
Figure 10 : (a) Image MALDI (mode positif) de l'ion à m/z 1058,7 à une distance entre les souches de 2,5 cm (b) Image MALDI (mode positif) de l'ion à m/z 1058,7 à une distance entre les souches de 1,5 cm. L'échantillon a été obtenu selon la méthode de dépôt direct. L'abréviation BS correspond à <i>B. subtilis</i> , C à la zone de compétition et PV à <i>P. variable</i> , la surface entre les souches correspond à la zone de compétition.	143
Figure 11 : Montage de l'échantillon destiné à l'imagerie TOF-SIMS. a) le papier filtre sur lequel la compétition a crû est découpé à l'aide d'un scalpel. b) L'échantillon est collé à l'aide d'un ruban adhésif double face conducteur.	144
Figure 12 : Spectre de masse MALDI-TOF du mélange d'acide tétronique. m/z 263,13 [M+H] ⁺ C ₁₅ H ₁₈ O ₄ +H ⁺ ; m/z 285,11 [M+Na] ⁺ C ₁₅ H ₁₈ O ₄ +Na ⁺ ; m/z 301,09 [M+K] ⁺ C ₁₅ H ₁₈ O ₄ +K ⁺ ; m/z 547,23 [2M+Na] ⁺ C ₃₀ H ₃₆ O ₈ +Na ⁺ .	146
Figure 13 : Spectre MALDI-TOF/TOF des ions fragments de l'ion à m/z 263,16.	146
Figure 14 : Spectre MALDI-TOF d'un standard de surfactine à 1 µg·µL ⁻¹ . Le spectre de gauche a été obtenu en polarité positive alors que le spectre de droite a été obtenu en polarité négative. Mode positif: m/z 1030,67 [M+Na] ⁺ C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃ +Na ⁺ ; m/z 1044,69	

[M+Na] ⁺ C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃ +Na ⁺ ;m/z 1046,64 [M+K] ⁺ C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃ +K ⁺ ;m/z 1058,71 [M+Na] ⁺ C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃ +Na ⁺ ;m/z 1060,66 [M+K] ⁺ C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃ +K ⁺ ;m/z 1074,67 [M+K] ⁺ C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃ +K ⁺ . Mode négatif : m/z 992,63 [M-H] ⁻ C ₅₀ H ₈₇ N ₇ O ₁₃ -H ⁻ ;m/z 1006,65 [M-H] ⁻ C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃ -H ⁻ ;m/z 1020,66 [M-H] ⁻ C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃ -H ⁻ ;m/z 1034,68 [M-H] ⁻ C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃ -H ⁻ .	147
Figure 15 : Spectres de masse TOF-SIMS du mélange d'acide tétronique à 0,75 mg·mL ⁻¹ a) mode positif, les annotations sont les suivantes 1) m/z 263,12 [M+H] ⁺ C ₁₅ H ₁₈ O ₄ +H ⁺ 2) m/z 285,10 [M+Na] ⁺ C ₁₅ H ₁₈ O ₄ +Na ⁺ 3) m/z 301,07 [M+K] ⁺ [C ₁₅ H ₁₈ O ₄ +K] ⁺ 4) m/z 525,23 [2M+H] ⁺ [C ₃₀ H ₃₆ O ₈ +H] ⁺ 5) m/z 547,19 [2M+Na] ⁺ [C ₃₀ H ₃₆ O ₈ +Na] ⁺ 6) m/z 563,20 [2M+K] ⁺ [C ₃₀ H ₃₆ O ₈ +K] ⁺ b) mode négatif, l'annotation est la suivante 7) m/z 261,12 [M-H] ⁻ [C ₁₅ H ₁₈ O ₄ -H] ⁻ .	149
Figure 16 : Spectre TOF-SIMS d'un standard de surfactines à 1 µg·µL ⁻¹ a) mode positif, les annotations sont les suivantes : 1) m/z 994,69 [M+H] ⁺ [C ₅₀ H ₈₇ N ₇ O ₁₃ +H] ⁺ 2) m/z 1008,68 [M+H] ⁺ [C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃ +H] ⁺ 3) m/z 1022,69 [M+H] ⁺ [C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃ +H] ⁺ 4) 1030,63 [M+Na] ⁺ [C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃ +Na] ⁺ 5) m/z 1036,73 [M+H] ⁺ [C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃ +H] ⁺ 6) m/z 1044,61 [M+Na] ⁺ [C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃ +Na] ⁺ 7) m/z 1058,71 [M+Na] ⁺ [C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃ +Na] ⁺ 8) m/z 1074,69 [M+K] ⁺ [C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃ +K] ⁺ b) mode négatif, les annotations sont les suivantes : 9) m/z 992,63 [M-H] ⁻ [C ₅₀ H ₈₆ N ₇ O ₁₃ -H] ⁻ 10) m/z 1006,66 [M-H] ⁻ [C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃ -H] ⁻ 11) m/z 1020,69 [M-H] ⁻ [C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃ -H] ⁻ 12) m/z 1034,70 [M-H] ⁻ [C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃ -H] ⁻ 13) m/z 1048,70 [M-H] ⁻ [C ₅₄ H ₉₅ N ₇ O ₁₃ -H] ⁻ .	149
Figure 17 : Spectre de masse de l'image entre m/z 1025 et 1100. On détecte 7 pics attribués (Voir Tableau 3) aux surfactines (mode positif). [C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃ +Na] ⁺ à m/z 1030,63 ; [C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃ +Na] ⁺ à m/z 1044,65 ; [C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃ +Na] ⁺ à m/z 1058,67 ; [C ₅₄ H ₉₅ N ₇ O ₁₃ +Na] ⁺ à m/z 1072,69 5) [C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃ +H ₂ O +Na] ⁺ à m/z 1074,65 ; [C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃ +H ₂ O +Na] ⁺ à m/z 1076,68 ; [C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃ +H ₂ O +K] ⁺ à m/z 1092,65.	151
Figure 18 : Images (MALDI-TOF mode positif) des ions suivants : (a) Surfactine C13 [M+Na] ⁺ C ₅₁ H ₈₉ N ₇ NaO ₁₃ ⁺ m/z 1030,6 (b) Surfactine C14 [M+Na] ⁺ C ₅₂ H ₉₁ N ₇ NaO ₁₃ ⁺ m/z 1044,7 (c) Surfactine C15 [M+Na] ⁺ C ₅₃ H ₉₃ N ₇ NaO ₁₃ ⁺ m/z 1058,7 (d) Surfactine C16 [M+Na] ⁺ C ₅₄ H ₉₅ N ₇ NaO ₁₃ ⁺ m/z 1072,7 (e) Surfactine C15 [M+K] ⁺ C ₅₃ H ₉₃ KN ₇ O ₁₃ ⁺ m/z 1074,7 (f) Surfactine C15 hydrolysée [M+H ₂ O+Na] ⁺ C ₅₃ H ₉₅ N ₇ NaO ₁₄ ⁺ m/z 1076,7 (g) Surfactine C15 hydrolysée [M+H ₂ O+K] ⁺ C ₅₃ H ₉₅ KN ₇ O ₁₄ ⁺ m/z 1092,7 (h) image optique de l'échantillon où le rectangle blanc représente la zone qui a été analysée. L'abréviation BS correspond à <i>B. subtilis</i> , C à la zone de compétition et PV à <i>P. variable</i> , la surface entre les souches correspond à la zone de compétition.	152
Figure 19 : (a) Superposition deux couleurs des images (MALDI-TOF mode positif) en rouge Surfactine C15 [M+Na] ⁺ C ₅₃ H ₉₃ N ₇ NaO ₁₃ ⁺ m/z 1058,7 et en vert Surfactine C15 hydrolysée [M+H ₂ O+Na] ⁺ C ₅₃ H ₉₅ N ₇ NaO ₁₄ ⁺ m/z 1076,7 (b) Superposition deux couleurs des images (MALDI-TOF mode positif) en rouge Surfactine C15 [M+K] ⁺ C ₅₃ H ₉₃ KN ₇ O ₁₃ ⁺ m/z 1074,7 et en vert Surfactine C15 hydrolysée [M+H ₂ O+K] ⁺ C ₅₃ H ₉₅ KN ₇ O ₁₄ ⁺ m/z 1092,7	153
Figure 20 : Spectre de masse de l'image MALDI-TOF entre m/z 1480 et 1550. Ces pics peuvent être attribués à la plipastatine (Polarité positive). [C ₇₃ H ₁₁₂ N ₁₂ O ₂₀ +Na] ⁺ à m/z 1499,84 2) ; [C ₇₄ H ₁₁₄ N ₁₂ O ₂₀ +Na] ⁺ à m/z 1513,87 ; C ₇₅ H ₁₁₆ N ₁₂ O ₂₀ +Na] ⁺ à m/z 1527,88.	154
Figure 21 : Formule développée de la plipastatine (n=5-7)	154

Figure 22 : (a-c) Cartes de densité ionique (MALDI-TOF) des 3 pics principaux détectés entre m/z 1480 et 1550. (a) Plipastatine C15 $[M+Na]^+$ $C_{73}H_{112}N_{12}NaO_{20}^+$ m/z 1499,8 (b) Plipastatine C16 $[M+Na]^+$ $C_{74}H_{114}N_{12}NaO_{20}^+$ m/z 1513,9 (c) Plipastatine C17 $[M+Na]^+$ $C_{75}H_{116}N_{12}NaO_{20}^+$ m/z 1527,9 (c) image optique de l'échantillon le carré blanc représente la zone qui a été analysée. L'abréviation BS correspond à <i>B. subtilis</i> , C à la zone de compétition et PV à <i>P. variable</i> , la surface entre les souches correspond à la zone de compétition.	155
Figure 23 : Superposition d'une photographie de l'échantillon (découpe de la compétition ayant crû sur du papier filtre) enregistrée avec la caméra du microscope ($\times 1,25$), et d'une photographie de la compétition microbienne.....	156
Figure 24 : Spectre de masse TOF-SIMS de la totalité de l'image (mode négatif) entre m/z 980 et 1080. 6 pics sont attribués à des ions de surfactines (Voir Tableau 5).	156
Figure 25 : Superposition deux couleurs des images (TOF-SIMS mode négatif) en rouge Surfactine C15 $[M-H]^-$ $C_{53}H_{92}N_7O_{13}^-$ m/z 1034,7 et en vert Surfactine C15 hydrolysée $[M-H]^-$ $C_{53}H_{92}N_7O_{13}^-$ m/z 1054,7.	157
Figure 26 : Superposition deux couleurs des images (TOF-SIMS mode négatif) en rouge Surfactine C15 $[M-H]^-$ $C_{53}H_{92}N_7O_{13}^-$ m/z 1034,7 et en vert Surfactine C15 hydrolysée $[M-H]^-$ $C_{53}H_{92}N_7O_{13}^-$ m/z 1054,7 sur laquelle sont indiquées les ROIs qui ont été dessinées. Spectres correspondants à ces ROIs.	158
Figure 27 : Spectre de masse TOF-SIMS de l'image (mode positif) entre m/z 1025 et 1100. On observe 6 pics attribués aux surfactines (Voir Tableau 6).	159
Figure 28 : Superposition deux couleurs des cartes de densité ionique (TOF-SIMS mode positif) en rouge Surfactine C15 $[M+Na]^+$ $C_{53}H_{93}N_7NaO_{13}^+$ m/z 1058,7 et en vert Surfactine C15 hydrolysée $[M+Na]^+$ $C_{53}H_{95}N_7NaO_{14}^+$ m/z 1076,7.	160
Figure 29 : Superposition deux couleurs des cartes de densité ionique (TOF-SIMS mode positif) en rouge Surfactine C15 $[M+Na]^+$ $C_{53}H_{93}N_7NaO_{13}^+$ m/z 1058,7 et en vert Surfactine C15 hydrolysée $[M+Na]^+$ $C_{53}H_{95}N_7NaO_{14}^+$ m/z 1076,7 sur laquelle sont présentées les ROIs qui ont été dessinées. Spectres de masse correspondants à ces ROIs.	160

Tableaux :

Tableau 1 : Récapitulatif de toutes les attributions et déviation standard en ppm pour les ions détectés après analyse de standard par MALDI-TOF.....	148
Tableau 2 : Récapitulatif de toutes les attributions et déviation standard en ppm pour les ions détectés après analyse de standard par TOF-SIMS.....	150
Tableau 3 : Rapports masse sur charge calculés et mesurés (m/z) et calcul de la déviation standard en ppm de chaque surfactine détectée sur le spectre de l'image MALDI-TOF (mode positif).	151
Tableau 4 : Rapports masse-sur-charge calculés, mesurés (m/z) et calcul de la déviation standard en ppm de chacun des ions détectés en imagerie MALDI-TOF (mode positif) et attribués à des plipastatines.....	155
Tableau 5 : Rapports masse sur charge calculés et mesurés (m/z) et calcul de la déviation standard en ppm de chaque ion de surfactine détecté lors de l'acquisition de l'image MALDI-TOF (mode positif).	157

Liste des illustrations

Tableau 6 : Rapports masse sur charge calculés et mesurés (m/z) et calcul de la déviation standard en ppm de chaque ion de surfactine détecté lors de l'acquisition de l'image TOF-SIMS (mode positif).	159
---	-----

Annexe

Rapid Commun. Mass Spectrom. **2015**, *29*, 1187–1195
(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/rcm.7210

Time-of-flight secondary ion mass spectrometry imaging of biological samples with delayed extraction for high mass and high spatial resolutions

Quentin P. Vanbellingen^{1†}, Nicolas Elie^{1†}, Michael J. Eller², Serge Della-Negra², David Touboul¹ and Alain Brunelle^{1*}

¹Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS-ICSN UPR2301, Université Paris-Sud, Avenue de la Terrasse, 91198, Gif-sur-Yvette, France

²Institut de Physique Nucléaire, UMR8608, IN2P3-CNRS, Université Paris-Sud, 91406, Orsay, France

RATIONALE: In Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (TOF-SIMS), pulsed and focused primary ion beams enable mass spectrometry imaging, a method which is particularly useful to map various small molecules such as lipids at the surface of biological samples. When using TOF-SIMS instruments, the focusing modes of the primary ion beam delivered by liquid metal ion guns can provide either a mass resolution of several thousand or a sub- μm lateral resolution, but the combination of both is generally not possible.

METHODS: With a TOF-SIMS setup, a delayed extraction applied to secondary ions has been studied extensively on rat cerebellum sections in order to compensate for the effect of long primary ion bunches.

RESULTS: The use of a delayed extraction has been proven to be an efficient solution leading to unique features, i.e. a mass resolution up to 10000 at m/z 385.4 combined with a lateral resolution of about 400 nm. Simulations of ion trajectories confirm the experimental determination of optimal delayed extraction and allow understanding of the behavior of ions as a function of their mass-to-charge ratio.

CONCLUSIONS: Although the use of a delayed extraction has been well known for many years and is very popular in MALDI, it is much less used in TOF-SIMS. Its full characterization now enables secondary ion images to be recorded in a single run with a submicron spatial resolution and with a mass resolution of several thousand. This improvement is very useful when analyzing lipids on tissue sections, or rare, precious, or very small size samples. © 2015 The Authors. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* published by John Wiley & Sons Ltd.

Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS) is based on the emission of secondary ions after the impact on a surface of keV energy primary ions. The possibility of tightly focusing the primary ion beam makes SIMS well suited for the generation of high spatial resolution ion images. In the early 1960s, Castaing and Slodzian described a process for producing an image based on the SIMS principle.^[1] Many improvements have been made over several decades. Among them, liquid metal ion guns (LMIG), delivering focused polyatomic ion beams, and reflectron time-of-flight (TOF)

analyzers, permit ion images of a sample surface to be generated with sub-micrometric spatial resolution and high mass resolution.^[2–4]

The use of clusters allows the study of lipid composition in biological systems involved in Fabry's disease,^[5] Duchene muscular dystrophy,^[6] non-alcoholic fatty liver disease,^[7] Alzheimer's disease,^[8] as well as natural substances in vegetal specimens,^[9,10] and microbiology,^[11] or organic and mineral compounds attributed to pigments in painting samples.^[12,13] In some cases it is possible to record images of a single cell.^[14,15] Furthermore, TOF-SIMS is used in diverse areas, such as cosmo-chemistry,^[16] and for the study of cultural heritage samples.^[17,18] Compared with other molecular mass spectrometry imaging methods, e.g. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI),^[19] TOF-SIMS is often criticized for its lower sensitivity and lower mass range.^[20] However, with the current state of the art, cluster TOF-SIMS is the biological mass spectrometry imaging method offering the best spatial resolution, ranging from a few hundreds of nanometers to a few microns. Nano-SIMS offers significantly higher spatial resolution, but can detect only small mass fragments or elements.^[21,22]

In TOF-SIMS two prominent ion beam focusing modes have been described.^[23–25] The so-called Burst Alignment

* Correspondence to: A. Brunelle, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS-ICSN UPR2301, Université Paris-Sud, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France.
E-mail: Alain.Brunelle@cnrs.fr

† These authors contributed equally to this work.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

(BA) is a mode which produces a very narrow beam diameter, well below one micron, using a pair of electrostatic lenses. The disadvantage of this method is the time width of the primary ion pulses, several tens of nanoseconds on the sample plane, which typically results in unit mass resolution. Another disadvantage is the low current of primary ions that necessitates long analysis times. The alternative High Current Bunched (HCBU) mode consists of using three electrostatic lenses and a primary ion buncher system to be produced, thus enabling very short pulses of less than one nanosecond. In this case, high mass resolution is achieved. The drawback is a larger beam diameter resulting in moderate spatial resolution of around a few microns. When analyzing samples such as tissue sections, high mass resolution and sufficient mass accuracy are needed in order to assign ion peaks, such as those of lipid species, with minimum ambiguity. Thus, the HCBU mode is mandatory. If better spatial resolution is needed, some authors have first recorded high-resolution mass spectra using the HCBU mode, before acquiring secondary ion images using the BA mode.^[26–28] Nevertheless this method is not fully satisfactory because, to reconstruct the ion images, the peak selection in the mass spectra is related to the time burst and consequently the mass separation is not sufficient to avoid the selection of quasi-isobaric species. Therefore, an operating mode combining both a high spatial resolution and high mass resolution is needed.

A method of combining these two features is to use a 'burst' mode, where the ion beam has a series of short pulses. In this case, long pulses provided by the BA mode are cut into a burst of successive short ion pulses, resulting in both high mass and high spatial resolutions.^[29] The disadvantage of this mode is that each of the short primary ion pulses generates its own secondary ion mass spectrum, separated in time by only 25 ns. This mode is acceptable for samples which only contain a few different species or when only low-mass ions are to be analyzed. For real biological samples, which require the analysis of heavier species such as lipids, the mass spectrum becomes too complex. In addition, the authors^[29] indicated that the primary ion current is much lower than in BA mode, thus increasing the time needed for data acquisition. Another method which also combines high mass resolution and high spatial resolution for TOF-SIMS instrumentation has recently been published for accurate measurement of isotopic abundances.^[30,31] In that case the primary ions focusing, termed "collimated burst alignment", enables a beam size of ~100 nm to be produced with a mass resolution of several thousands. However, this approach also results in very low primary ion currents, well adapted to avoid dead times in secondary ion detection, but it requires long acquisition times, incompatible with the analysis of lipid species on tissue sections.

An entirely different way which has been investigated is to adapt or build instruments other than the usual reflectron-type mass spectrometers. The concept is to use non-pulsed primary ion beams in order to circumvent the disadvantage in having to choose between mass and spatial resolution. An example of such an approach uses a fullerene ion source fitted to a commercial quadrupole time-of-flight (QTOF) instrument.^[32–35] A second new instrument has been designed, in which secondary ions generated by a DC primary ion beam are sampled using a buncher before being mass analyzed by a specially designed TOF analyzer.^[33–36]

An alternative method to maintain the mass resolution with high spatial resolution is to extract secondary ions from the sample surface with a certain delay after the arrival of primary ions. Delayed extraction was first demonstrated by Wiley and McLaren^[37] and is used in MALDI. The Wiley and McLaren device uses a simple technique which compensates by means of pulsed extraction for the ion time-of-flight differences induced by distributions of either initial ion velocity or ion position (but not for both simultaneously). In MALDI, spatial and velocity distributions are correlated and it is possible to find a good set of delay times and strength fields to correct for the initial velocity distribution of ions.^[38,39] In TOF-SIMS it can also be used to compensate for the departure time of secondary ions when using long primary ion bunches as in the present case of the BA mode if the ion velocity distribution is not too large. Several authors have mentioned the use of a delayed extraction: in the case of ions produced after ion/surface collisions,^[40] in depth profiling of Langmuir-Blodgett^[41] and of peptides films,^[42] in the analysis of eukaryotic cells preserved in trehalose,^[43] in the analysis of human skin remains,^[17] in the depth profiling of nanostructured layers,^[44] in sputtering of silicate glasses,^[45] and in the study of topographic and field effects.^[46]

Although already used by several authors,^[17,40–46] the effect of a delayed extraction on the resulting mass spectra has never been fully described, much less so in the case of biological tissue imaging. In the present work, a detailed study of the different primary ion beam focusing modes of a TOF-SIMS instrument has been performed, with extensive comparisons of mass and spatial resolutions on rat cerebellum sections, and with the aim of obtaining with delayed extraction the best compromise between mass resolution, spatial resolution, and acquisition time.

EXPERIMENTAL

Rat cerebellum sections

Rat cerebellum sections (16 μm thick) were cut at -20°C in a CM3050-S cryostat (Leica Microsystems SAS, Nanterre, France) and immediately deposited on silicon wafers (2 in. diameter polished silicon wafers; ACM, Villiers-Saint-Frédéric, France). The sections were then dried under vacuum for 10 min before analysis.

TOF-SIMS

Experiments were performed using a TOF-SIMS IV mass spectrometer (see Fig. 1; ION-TOF GmbH, Münster, Germany), located at the Institut de Chimie des Substances Naturelles (CNRS, Gif-sur-Yvette, France). This instrument is equipped with a LMIG which delivers a Bi_n^{q+} (with $n = 1-7$ and $q = 1$ or 2) pulsed cluster ion beam. Primary ions impact the sample with a kinetic energy of 25 kqV at an incidence angle of 45° . All the experiments presented were carried out with Bi_3^+ . The emitted secondary ions were accelerated to a kinetic energy of 2 keV (2 kV extraction) toward a field-free region and a single-stage reflectron (first-order compensation). Secondary ions were post-accelerated to a kinetic energy of 10 keV before hitting the detector composed of a micro-channel plate, a scintillator and a photomultiplier. Between two successive

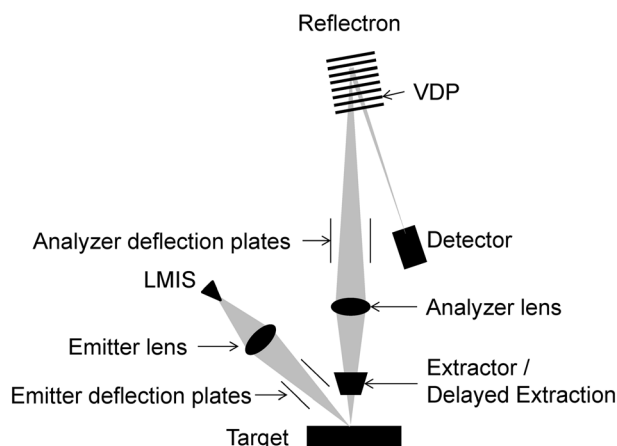


Figure 1. Schematic view of a TOF-SIMS IV instrument. VDP: Variable drift path.

primary ion pulses, a low energy (~ 20 eV) electron flood gun was used to neutralize the sample surface. Pulsed primary ion currents were measured with a Faraday cup located on the grounded sample holder. For HCBU focusing mode, three lenses were used. For the BA focusing mode, only two lenses were used. Typically, the diameter of the beam in HCBU is $2\text{--}5\text{ }\mu\text{m}$ and 400 nm in BA mode.^[47]

Protocol for optimization of mass and spatial resolutions using a delayed extraction

To improve the mass resolution, a delayed extraction approach, already existing in the TOF-SIMS setup, can be used. The extraction voltage is set to 2 kV, the rise time to 40 ns and the delay is adjustable between $-5\text{ }\mu\text{s}$ and $+20\text{ }\mu\text{s}$ in steps of 5 ns. The delayed extraction was tuned by measuring both the spatial resolution ('knife edge method') and the mass resolution.

On the surface of a rat cerebellum section, images in positive and negative ion mode with an analyzed area of $100\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$ and with a pixel size of $0.78\text{ }\mu\text{m}$ were recorded with a fluence of $2.25 \times 10^{11}\text{ ions}\cdot\text{cm}^{-2}$. The mass resolution of lipid ion peaks was measured for each image from a square ($50\text{ }\mu\text{m} \times 50\text{ }\mu\text{m}$) in the center of the image. Step-by-step, the extraction delay was increased and for each new extraction delay the settings of the mass spectrometer were optimized. This included adjusting the voltages applied to the X and Y analyzer deflection plates, the voltage on the analyzer lens, and the variable drift path (VDP) voltage (Fig. 1). These optimizations ensured that the secondary ions are correctly collected and time focused on the detector allowing for high transmission and high mass resolution.^[48] Furthermore, the delayed extraction voltage modifies the beam raster area. Thus, the voltages applied to the so-called X and Y sensitivity plates (not shown) need also to be adjusted. Each measurement was performed in triplicate.

In order to measure the spatial resolution, images with a fluence of $2 \times 10^{12}\text{ ions}\cdot\text{cm}^{-2}$ in both positive and negative ion mode with an analyzed area of $100\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$ and a pixel size of $0.2\text{ }\mu\text{m}$ for HCBU and $0.1\text{ }\mu\text{m}$ for BA were recorded on the grounded 1000 lines per inch grid located on the sample holder. Line scans were performed perpendicular to the ion beam axis. Scanning the primary

ion beam along a straight edge object allows the beam diameter to be measured, provided that the measurement step, which is defined by the pixel size, is much smaller.^[49,50]

Mass spectrometry imaging

On a rat cerebellum section, images in both negative and positive ion mode were acquired to evaluate each acquisition mode. The desired result is to distinguish Purkinje cells, which are very small structures present in the tissue.^[26,51–53] An analyzed area of $400\text{ }\mu\text{m} \times 400\text{ }\mu\text{m}$ and a pixel size of $0.4\text{ }\mu\text{m}$ were used in BA and in BA plus delayed extraction (BA+DE). In the HCBU operating mode, an analyzed area of $500\text{ }\mu\text{m} \times 500\text{ }\mu\text{m}$ and a pixel size of $1.9\text{ }\mu\text{m}$ were chosen. The images were recorded with fluence of $5 \times 10^{11}\text{ ions}\cdot\text{cm}^{-2}$ in HCBU and of $2 \times 10^{12}\text{ ions}\cdot\text{cm}^{-2}$ in BA mode. Due to the very low initial kinetic energy distribution of the secondary ions,^[54] the relationship between the time of flight and the square root of the m/z value is always linear over the whole mass range. The mass calibration was always internal, and signals used for initial calibration were those of H^+ , H_2^+ , H_3^+ , C^+ , CH^+ , CH_2^+ , CH_3^+ , C_2H_3^+ and C_2H_5^+ for the positive ion mode in HCBU and BA acquisition and those of C^- , CH^- , CH_2^- , C_2^- , C_3^- and C_4H^- for the negative polarity in HCBU and BA acquisition mode. As lighter ions (below m/z 20) in BA+DE acquisition mode are poorly collected by the mass spectrometer, the calibration was still internal with these settings but the signals used were those of $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{PNO}_4^+$ (m/z 224.11), $\text{C}_{27}\text{H}_{45}^+$ (m/z 369.35), $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{O}^+$ (m/z 385.35) and $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2^{+\bullet}$ (m/z 430.38) for the positive ion mode, and those of $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}_2^-$ (m/z 255.23), $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}_2^-$ (m/z 281.25), $\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{O}_2^-$ (m/z 283.26), $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{O}^-$ (m/z 385.35) and $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{O}_2^-$ (m/z 429.37) in negative ion mode.

Simulation

The ion trajectories and their TOFs were calculated by computer modeling using SIMION 8.1.1.32-2013-05-20 (Scientific Instrument Services Inc., Ringoes, NJ, USA). The generated ions are evenly distributed from 0 to 100 ns in order to simulate the primary ion pulse duration. The ions are generated at a distance of 1.5 mm from the extraction cone, which is the same as in the instrument. The angular emittance of the ions is $\pm 7^\circ$ from a Gaussian distribution. The extraction voltage is 2 kV and the initial kinetic energies varied from 0.1 to 1.0 eV.

RESULTS AND DISCUSSION

Delayed extraction optimization

The delayed extraction (DE) was tuned by measuring the mass resolution of several secondary ions detected from the surface of a rat cerebellum section. The optimum delay is determined by a compromise between the mass resolution and the total ion count rate, the peak shape being preserved. In the negative ion mode, mass resolutions of 10000 and 9000 are obtained for the palmitate $[\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}_2]^-$ (m/z 255.2) and cholesterol $[\text{M}-\text{H}]^-$ (m/z 385.4) ions, respectively (Fig. 2(a)). In positive ion mode, mass resolutions of 10000 for both the cholesterol $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ ion (m/z 369.4) and the vitamin E $[\text{M}]^{+\bullet}$ ion (m/z 430.4) were measured (Fig. 2(b)).

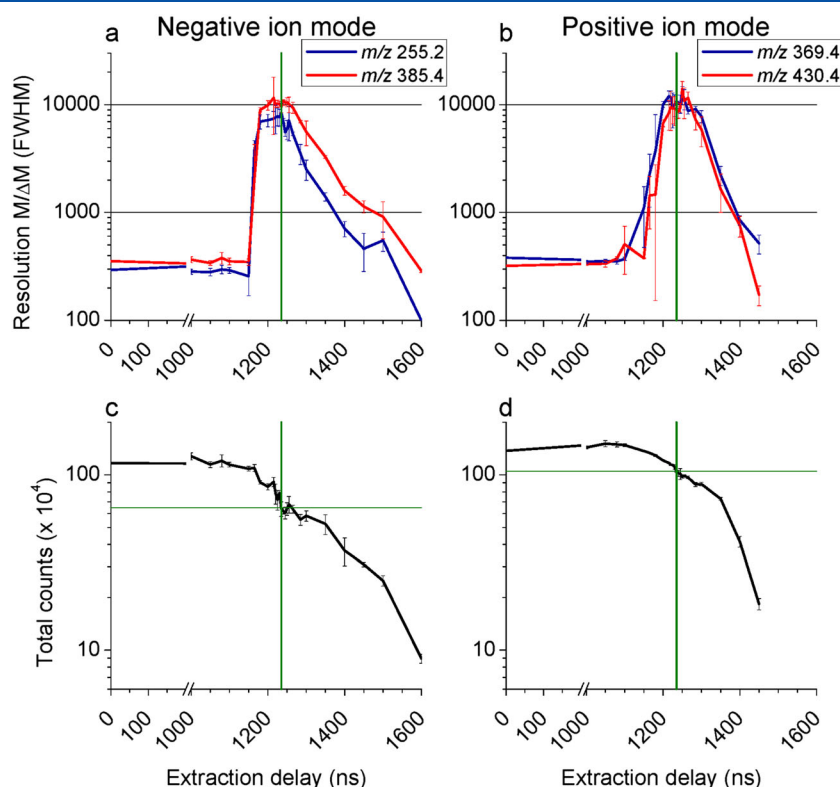


Figure 2. Mass resolutions (FWHM) measured for different secondary ions (a, b) and total ion count as a function of the extraction delay in negative (a, c) and positive (b, d) ion mode. Green lines are to guide the eye and show the optimum extraction delay of 1235 ns and the total ion count measured at this value. Pulse duration was 100 ns.

Without DE being applied and in both positive and negative ion mode, the peaks at m/z 255.2, 369.4, 385.4 and 430.4 exhibit a width (FWHM) of ~100 ns, which corresponds to the pulse duration of the primary ions (See Supplementary Fig. S-1, Supporting Information). This parameter strongly limits the mass resolution and the use of DE allows this physical limitation to be overcome.

Another important parameter is the peak shape (Fig. 3). This allows for the exclusion of extraction delays for which a higher mass resolution is obtained but with asymmetric peaks.

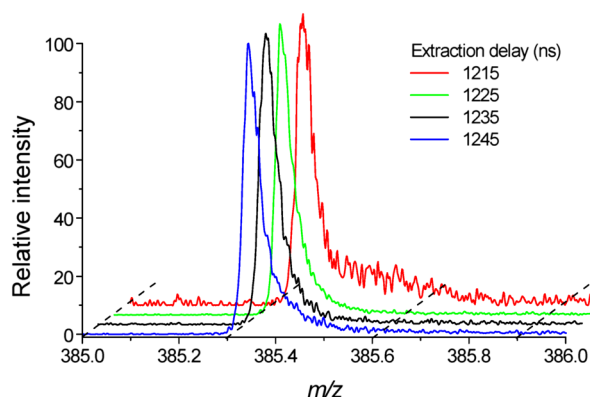


Figure 3. Overlays of four parts of negative ion mass spectra showing the cholesterol $[M-H]^-$ ion peak at m/z 385.4 acquired with different extraction delays.

The drawback of DE is a lower secondary ion transmission. As shown in Figs. 2(c) and 2(d), the ion peak intensities are half of those obtained without DE. This will be discussed further in the following section.

After optimization, the spatial resolution of each mode has been measured according to the knife edge method (see Supplementary Fig. S-2, Supporting Information). The results are summarized in Table 1. A clear decrease in the beam diameter is observed when comparing HCBU and BA modes. However, a similar beam diameter of ~0.4 μm was measured in BA mode with or without the DE indicating that the DE is fully compatible with high lateral resolution. It must be also noted that there is no significant modification of the mass resolution caused by using the DE in the HCBU focusing mode (data not shown).

Simulation

Simulations of secondary ion trajectories were performed with the SIMION software. Figure 4 shows the normalized intensity as a function of the calculated TOF for ions with an m/z of 400 (time bin of 2 ns) with different extraction delays (50 ns, 100 ns, 150 ns, and 200 ns). For an extraction delay of 50 ns, the first emitted ions are well grouped in time, unlike the ions emitted after the extraction potential is applied. This means that the DE only groups the ions emitted during the first 50 ns, as the other ions are shifted as a function of the emission time. If the extraction delay corresponds exactly to the duration of ion production, all the ions are grouped together and a high resolution peak is obtained. Without an

Table 1. Main features of the three setting modes and consequent optimum parameters for data acquisition

Focusing mode	HCBU	BA	BA+DE
Mass resolution ^a ($M/\Delta M$, Full Width at Half Maximum [FWHM])	5340	324	9270
Beam size (μm)	2.9 ± 0.2	0.45 ± 0.06	0.46 ± 0.07
Extraction delay (ns)	0	0	1235
Pulsed primary ion current ^b (pA)	0.28	0.088	0.088
Image size (μm)	500×500	400×400	400×400
Number of pixels and pixel size (μm)	256×256 (1.95)	1024×1024 (0.39)	1024×1024 (0.39)
Primary ion dose (ions $\cdot\text{cm}^{-2}$)	5×10^{11}	2×10^{12}	4×10^{12}
Acquisition time (h)	$\frac{1}{4}$	2	4

^aMass resolutions have been measured in a center square region of interest of $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$, in negative mode on the m/z 385.4 ion peak.

^bPrimary ion current has been measured at a frequency of 10 kHz.

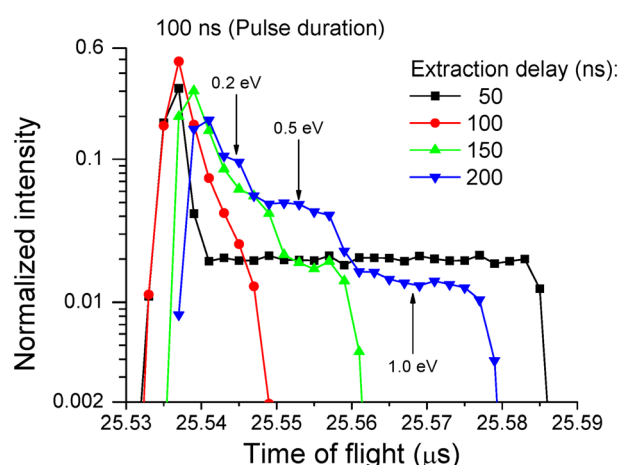


Figure 4. Simulated mass spectra of m/z 400 ions with different initial kinetic energy values (0.1, 0.2, 0.5 and 1.0 eV), produced during a burst length of 100 ns and extracted after a delay of 50 ns (black), 100 ns (red), 150 ns (green), and 200 ns (blue), respectively. Vertical arrows indicate, for 200 ns extraction delay, the groups of ions having initial kinetic energies of 0.2, 0.5, and 1.0 eV, respectively.

accelerating potential during the arrival of the primary ion pulse, the initial axial velocity of the ions leads to a distribution in the acceleration region and subsequently a distribution in TOF. This distribution in time and distance from the sample seems to be compensated for during the TOF. The compensation is related to the energy fixed by the potential corresponding to their position when the extraction potential is applied and the use of the reflectron. For example, for ions emitted normal to the surface at time zero with an initial energy of 0.5 eV, after 100 ns when the extraction voltage is applied: a m/z 1 ion will be ~ 1 mm from the surface and the potential at this distance is 1333 V, for a m/z 10 ion this distance will be $\sim 300 \mu\text{m}$ with a potential of 410 V, and for a m/z 400 ion we obtain a distance of $\sim 50 \mu\text{m}$ from the surface which would correspond to a potential of 66 V. If the extraction delay is longer than the primary pulse time, the dispersion in position induces a larger difference in energy which does not permit good time compensation, and leads to a tail towards longer TOFs.

The optimum values of the DE, as revealed by these simulations, are significantly smaller than those obtained in the experimental measurements. This is because the instrumental delayed extraction times are calculated using time zero as the pulsation of the primary ions (chopper); the primary ion TOF from the chopper to the sample is thus incorporated into the extraction delay time, while the simulations do not incorporate this time. Therefore, the offset of the experimental extraction delay relative to the simulation values is the summation of the primary ion TOF and the rise time of the extraction pulse.

To determine this offset, the extraction delay was increased step-by-step until the peak of the H^- ion started to shift in time. This phenomenon appears between 1095 and 1100 ns (see Supplementary Fig. S-3, Supporting Information). A linear regression was used to confirm the linear relation between the optimum extraction delay and the primary ion pulse duration. The offset value determined with this method is 1137 ± 8 ns (see Fig. 5). The difference of about 40 ns between these two values could correspond to the rise time of the extraction pulse. Using the value of 1137 ns as the offset between the experiment and the simulation, we find that the simulation would give an

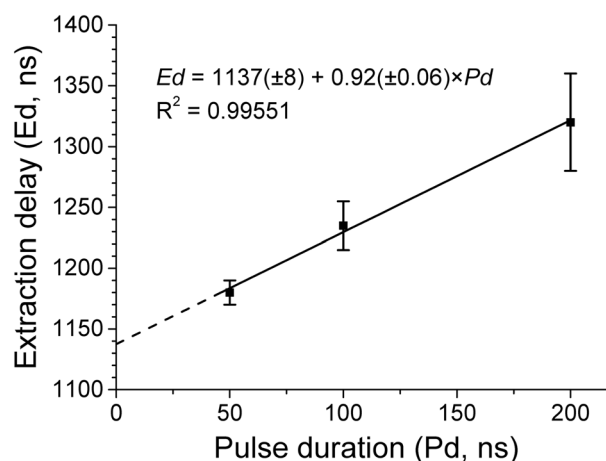


Figure 5. Optimum secondary ion extraction delay as a function of the pulse duration of primary ions burst. Equation of the calculated linear regression (solid line), with E_d , Extraction delay; P_d , Pulse duration; and R , coefficient of correlation.

optimal delayed extraction time of 1237 ns for a pulse duration of 100 ns. Recalling that the optimum delayed extraction time determined experimentally was 1235 ns, we find excellent agreement between the simulation and the experiment.

Another simulation to investigate the effect of secondary ion initial kinetic energy on mass resolution was performed, where the analyzer acts as a kinetic energy filter. Supplementary Fig. S-4 (Supporting Information) shows the arrival position of secondary ions on the surface of the micro-channel plate (MCP). The ions with an m/z of 400 and

a kinetic energy of 0.1 and 0.2 eV are well focused on the center of the MCP. On the contrary, the ions with larger kinetic energies of 0.5 and 1.0 eV have a larger spot size which is displaced from the center. The increased spot size and modified trajectory are a consequence of the higher initial velocity of these species, which have larger energy deficit due to their position when the extraction potential is applied. This phenomenon could be responsible for the observed decrease in total ion counts, although the secondary ion optics were optimized to maximize the total ion count rate.

Finally, the trajectories of ions at different mass-to-charge ratios with same kinetic energy of 0.1 eV were studied in BA +DE mode and with the optimum value of the extraction delay. Supplementary Fig. S-5 (Supporting Information) shows that trajectories of ions with low mass-to-charge ratio are displaced from the center of the MCP. This result is similar to the previous case as the ions with higher initial velocities have larger energy deficits and thus their trajectories exiting the reflectron are displaced relative to lower kinetic energy ions. This result could explain why lighter ions (lower than m/z 20) are poorly detected with the DE as even low kinetic energy species obtain large energy deficits.

These low-mass ions are usually used in TOF-SIMS for the calibration of the mass spectra. Since the DE induces a kinetic energy deficit depending on the mass-to-charge ratio of the ions, the relationship between the measured TOF and the square root of the m/z is then not linear, especially for light ions, and thus the spectra could not be calibrated using these light mass ions. To obtain a sufficient mass accuracy (usually ~20–50 ppm for TOF-SIMS analysis of tissue samples) for ions of interest, it is better to surround

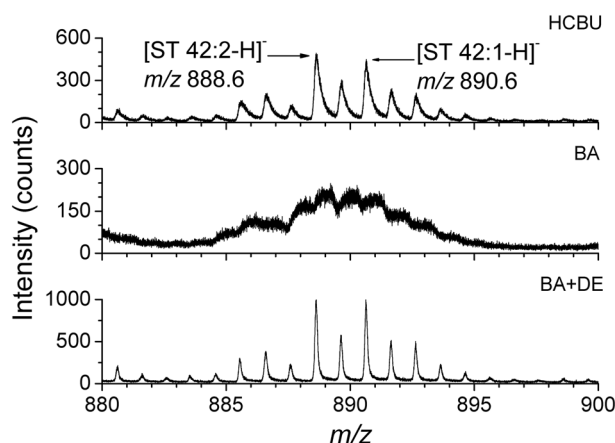


Figure 6. Part of the TOF-SIMS negative ion mass spectra recorded at the surface of a rat cerebellum section, using HCBU, BA, and BA+DE setting modes and showing sulfatide ion peaks.

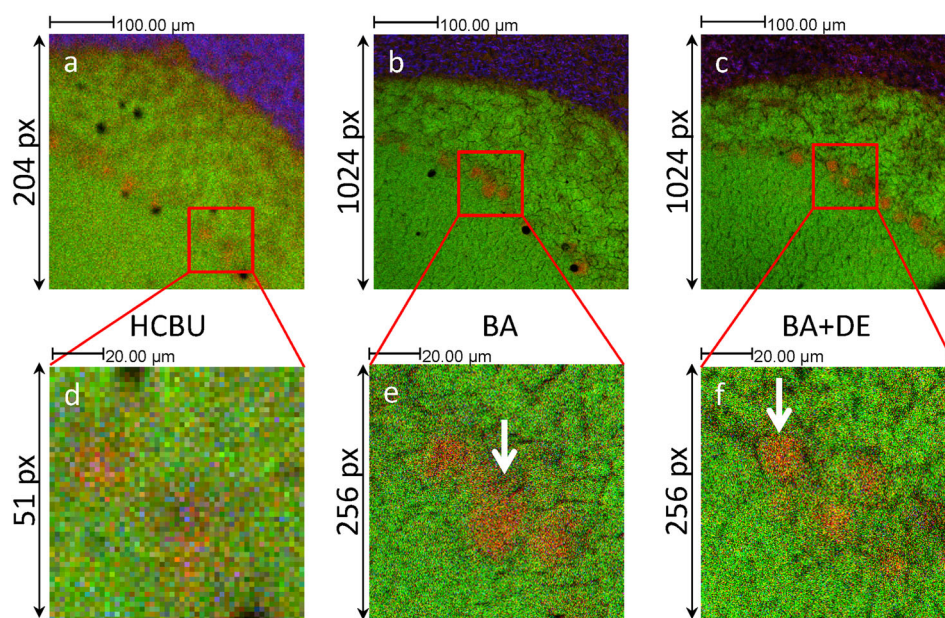


Figure 7. TOF-SIMS negative ion images recorded at the surface of a rat cerebellum and with different setting modes, showing three color overlays between three different secondary ions: $[C18:0-H]^-$ m/z 283.3 (red), $[C16:0-H]^-$ m/z 255.2 (green), and cholesterol $[M-H]^-$ m/z 385.4 (blue). (a) HCBU, (b) BA, (c) BA+DE. (d, e, and f) zooms of the 100 $\mu m \times 100 \mu m$ center part of a, b, and c ion images, respectively. Arrows in the images show some Purkinje cells. Analyzed area and number of pixels according to Table 1. The ion image in HCBU has been cropped at a dimension of 400 $\mu m \times 400 \mu m$ to be directly compared with the other ion images.

the peaks of interest with peaks of known masses, and adding an internal standard should be considered in future experiments.

Application to lipid imaging on rat cerebellum sections

Secondary ion images of the surface of rat cerebellums were recorded for all acquisition modes; the settings are detailed in Table 1. Figure 6 illustrates the differences in mass resolution between HCBU, BA and BA+DE modes in a selected region of the mass spectra, showing sulfatide ion peaks. The isotope peaks for the sulfatide ions cannot be resolved using the BA settings but are well separated in BA+DE mode. Similar results for fatty acids in negative ion mode and cholesterol and vitamin E in positive ion mode are shown in Supplementary Figs. S-6 and S-7 (Supporting Information), respectively.

In order to illustrate the lateral resolution performances of each focusing mode, special attention was paid on the localization of Purkinje cells, which are localized in the gray matter.^[55,56] These cells have an average size of about 20 μm and exhibit a specific lipid composition. Figure 7 shows three-color overlays of ion images obtained for the $[\text{C18:0-H}]^-$ ion (m/z 283.3) in red, the $[\text{C16:0-H}]^-$ ion (m/z 255.2) in green, and the cholesterol $[\text{M-H}]^-$ ion (m/z 385.4) in blue, acquired in the three different modes. In Fig. 7(a) (HCBU), while it is possible to distinguish the different histological areas of the cerebellum, the Purkinje cells, defined by a higher intensity of the $[\text{C18:0-H}]^-$ ion signal in red, are poorly resolved. In the zoom of Fig. 7(a) (shown in Fig. 7(d)), individual pixels are clearly visible. Figures 7(b) and 7(c) show the images recorded using the BA and BA+DE modes, respectively. Under these conditions, the Purkinje cells are well defined and fine details of the tissue structure can be distinguished, due to a sub- μm lateral resolution.

CONCLUSIONS

Although the use of a delayed extraction has been known for many years and is very popular in MALDI, it has been used much less in TOF-SIMS. Its utilization now enables secondary ion images of molecule-related ions to be recorded with submicron spatial resolution and a mass resolution of several thousand in a single run. Simulation shows that the optimal extraction delay needs to be equal to the primary ion pulse duration, and an excellent agreement is found by experiment. However, the use of the BA+DE setting mode requires a larger primary ion dose density in order to obtain ion images with intensity scales comparable with those recorded with the other modes, such as HCBU.

Another way to obtain high mass resolution and spatial resolution together is to acquire HCBU and BA images on the same area, successively.^[15,28] However, switching from one mode to another takes significant time, especially if a large number of acquisitions is needed, and often the mass assignment is not precise enough with the poor mass resolution obtained in BA mode. In such cases the use of delayed extraction is a better choice, particularly when analyzing rare, precious, or very small samples, such as archeological samples or painting cross-sections.

Acknowledgements

Felix Kollmer (ION-TOF GmbH) is gratefully acknowledged for fruitful discussions. This work has benefited from an 'Investissement d'Avenir' grant managed by Agence Nationale de la Recherche (CEBA, ref. ANR-10-LABX-25-01). Q.P.V. is indebted to the *Fondation pour le développement de la chimie des substances naturelles et ses applications* for a PhD research fellowship. M.J.E. would like to thank P2IO LabEx for financing his post-doctoral fellowship in the framework of the Andromede project (ANR-13-EQPX-10).

REFERENCES

- [1] R. Castaing, G. Slodzian. Microanalyse par émission secondaire. *J. Microsc.* **1962**, *1*, 395.
- [2] D. Touboul, O. Laprévote, A. Brunelle. Medical and biological applications of cluster ToF-SIMS, in *TOF-SIMS: Materials Analysis by Mass Spectrometry*, (2nd edn.), (Eds: J. C. Vickerman, D. Briggs). IM Publications, Chichester, **2013**, pp. 583–612.
- [3] N. Winograd. Imaging mass spectrometry on the nanoscale with cluster ion beams. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 328.
- [4] C. Bich, D. Touboul, A. Brunelle. Cluster TOF-SIMS imaging as a tool for micrometric histology of lipids in tissue. *Mass Spectrom. Rev.* **2014**, *33*, 442.
- [5] D. Touboul, S. Roy, D. P. Germain, P. Chaminade, A. Brunelle, O. Laprévote. MALDI-TOF and cluster-TOF-SIMS imaging of Fabry disease biomarkers. *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, *260*, 158.
- [6] D. Touboul, A. Brunelle, F. Halgand, S. De La Porte, O. Laprévote. Lipid imaging by gold cluster time-of-flight - secondary ion mass spectrometry: application to Duchenne muscular dystrophy. *J. Lipid Res.* **2005**, *46*, 1388.
- [7] D. Debois, M. P. Bralet, F. Le Naour, A. Brunelle, O. Laprévote. *In situ* lipidomic analysis of non-alcoholic fatty liver by cluster TOF-SIMS imaging. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 2823.
- [8] S. Solé-Domènech, P. Sjövall, V. Vukojević, R. Fernando, A. Codita, S. Salve, N. Bogdanović, H. A. Mohammed, P. Hammarström, K. P. R. Nilsson, M. F. LaFerla, S. Jacob, P. O. Berggren, L. Giménez-Llort, M. Schalling, L. Terenius, B. Johansson. Localization of cholesterol, amyloid and glia in Alzheimer's disease transgenic mouse brain tissue using time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) and immunofluorescence imaging. *Acta Neuropathol.* **2013**, *125*, 145.
- [9] A. Seyer, J. Einhorn, A. Brunelle, O. Laprévote. Localization of flavonoids in seeds by cluster time-of-flight secondary ion mass spectrometry imaging. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 2326.
- [10] K. Saito, T. Mitsutani, T. Imai, Y. Matsushita, K. Fukushima. Discriminating the indistinguishable sapwood from heartwood in discolored ancient wood by direct molecular mapping of specific extractives using time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1552.
- [11] D. Debois, K. Hamze, V. Guérineau, J. P. Le Caër, I. B. Holland, P. Lopes, J. Ouazzani, S. J. Séror, A. Brunelle, O. Laprévote. *In situ* localization and quantification of surfactins in a *Bacillus subtilis* swarming community by imaging mass spectrometry. *Proteomics* **2008**, *8*, 3682.
- [12] P. Richardin, V. Mazel, P. Walter, O. Laprévote, A. Brunelle. Identification of different copper green pigments in Renaissance paintings by cluster-TOF-SIMS imaging analysis. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2011**, *22*, 1729.
- [13] V. Mazel, P. Richardin, D. Touboul, A. Brunelle, C. Richard, E. Laval, P. Walter, O. Laprévote. Animal urine as painting materials in African rock art revealed by cluster ToF-SIMS mass spectrometry imaging. *J. Mass Spectrom.* **2010**, *45*, 944.

- [14] P. Sjövall, J. Lausmaa, H. Nygren, L. Carlsson, P. Malmberg. Imaging of membrane lipids in single cells by imprint-imaging time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3097.
- [15] T. Leefmann, C. Heim, A. Kryvenda, S. Siljeström, P. Sjövall, V. Thiel. Biomarker imaging of single diatom cells in a microbial mat using time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS). *Org. Geochem.* **2013**, *57*, 23.
- [16] T. Stephan, E. K. Jessberger, C. H. Heiss, D. Rost. TOF-SIMS analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in Allan Hills 84001. *Meteorit. Planet. Sci.* **2003**, *38*, 109.
- [17] C. Cersoy, P. Richardin, P. Walter, A. Brunelle. Cluster TOF-SIMS imaging of human skin remains: analysis of a South-Andean mummy sample. *J. Mass Spectrom.* **2012**, *47*, 338.
- [18] V. Mazel, P. Richardin, D. Debois, D. Touboul, M. Cotte, A. Brunelle, P. Walter, O. Laprévote. Identification of ritual blood in African artifacts using TOF-SIMS and synchrotron radiation microspectroscopies. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 9253.
- [19] L. A. McDonnell, R. M. A. Heeren. Imaging mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, *26*, 606.
- [20] B. Spengler. Mass spectrometry imaging of biomolecular information. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 64.
- [21] C. P. Lechene, Y. Luyten, G. McMahon, D. L. Distel. Quantitative imaging of nitrogen fixation by individual bacteria within animal cells. *Science* **2007**, *317*, 1563.
- [22] D. S. Zhang, V. Piazza, B. J. Perrin, A. K. Rzedzinska, J. C. Poczatek, M. Wang, H. M. Prosser, J. M. Ervasti, D. C. Corey, C. P. Lechene. Multi-isotope imaging mass spectrometry reveals slow protein turnover in hair-cell stereocilia. *Nature* **2012**, *481*, 520.
- [23] R. N. S. Sodhi. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS): versatility in chemical and imaging surface analysis. *Analyst* **2004**, *129*, 483.
- [24] D. Touboul, F. Kollmer, E. Niehuis, A. Brunelle, O. Laprévote. Improvement of biological TOF-SIMS imaging with a bismuth cluster ion source. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 1608.
- [25] A. Brunelle, D. Touboul, O. Laprévote. Biological tissue imaging with time-of-flight secondary ion mass spectrometry and cluster ion sources. *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40*, 985.
- [26] H. Nygren, P. Malmberg, C. Kriegeskotte, H. F. Arlinghaus. Bioimaging TOF-SIMS: localization of cholesterol in rat kidney sections. *FEBS Lett.* **2004**, *566*, 291.
- [27] H. Nygren, K. Börner, B. Hagenhoff, P. Malmberg, J. E. Månsson. Localization of cholesterol, phosphocholine and galactosylceramide in rat cerebellar cortex with imaging TOF-SIMS equipped with a bismuth cluster ion source. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1737*, 102.
- [28] Z. Pernber, K. Richter, J. E. Månsson, H. Nygren. Sulfatide with different fatty acids has unique distributions in cerebellum as imaged by time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS). *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1771*, 202.
- [29] J. Brison, M. A. Robinson, D. S. W. Benoit, S. Muramoto, P. S. Stayton, D. G. Castner. TOF-SIMS 3D imaging of native and non-native species within HeLa cells. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 10869.
- [30] G. Holzlechner, M. Kubicek, H. Hutter, J. Fleig. A novel ToF-SIMS operation mode for improved accuracy and lateral resolution of oxygen isotope measurements on oxides. *J. Anal. Atom. Spectrom.* **2013**, *28*, 1080.
- [31] M. Kubicek, G. Holzlechner, A. K. Opitz, S. Larisegger, H. Hutter, J. Fleig. A novel ToF-SIMS operation mode for sub 100 nm lateral resolution: Application and performance. *Appl. Surf. Sci.* **2014**, *289*, 407.
- [32] A. Carado, M. K. Passarelli, J. Kozole, J. E. Wingate, N. Winograd, A. V. Loboda. C₆₀ secondary ion mass spectrometry with a hybrid-quadrupole orthogonal time-of-flight mass spectrometer. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 7921.
- [33] J. S. Fletcher, J. C. Vickerman. A new SIMS paradigm for 2D and 3D molecular imaging of bio-systems. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396*, 85.
- [34] J. S. Fletcher, N. P. Lockyer, J. C. Vickerman. Developments in molecular SIMS depth profiling and 3D imaging of biological systems using polyatomic primary ions. *Mass Spectrom. Rev.* **2011**, *30*, 142.
- [35] J. S. Fletcher, J. C. Vickerman. Secondary ion mass spectrometry: characterizing complex samples in two and three dimensions. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 610.
- [36] J. S. Fletcher, S. Rabbani, A. Henderson, P. Blenkinsopp, S. P. Thompson, N. P. Lockyer, J. C. Vickerman. A new dynamic in mass spectral imaging of single biological cells. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 9058.
- [37] W. C. Wiley, I. H. McLaren. Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution. *Rev. Sci. Instrum.* **1955**, *26*, 1150.
- [38] M. L. Vestal, P. Juhasz, S. A. Martin. Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9*, 1044.
- [39] P. Juhasz, M. L. Vestal, S. A. Martin. On the initial velocity of ions generated by matrix-assisted laser desorption ionization and its effect on the calibration of delayed extraction time-of-flight mass spectra. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1997**, *8*, 209.
- [40] L. L. Hanay, D. E. Riederer. Delayed extraction for improved resolution of ion/surface collision products by time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *397*, 225.
- [41] A. G. Sostarecz, C. M. McQuaw, A. Wucher, N. Winograd. Depth profiling of Langmuir-Blodgett films with a buckminsterfullerene probe. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6651.
- [42] J. Cheng, N. Winograd. Depth profiling of peptide films with TOF-SIMS and a C₆₀ probe. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3651.
- [43] S. Parry, N. Winograd. High-resolution TOF-SIMS imaging of eukaryotic cells preserved in a trehalose matrix. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 7950.
- [44] S. V. Baryshev, A. V. Zinovev, C. E. Tripa, M. J. Pellin, Q. Peng, J. W. Elam, I. V. Veryovkin. High-resolution secondary ion mass spectrometry depth profiling of nanolayers. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012**, *26*, 2224.
- [45] A. King, T. Henkel, D. Rost, I. C. Lyon. Determination of relative sensitivity factors during secondary ion sputtering of silicate glasses by Au⁺, Au₂⁺ and Au₃⁺ ions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 15.
- [46] J. L. S. Lee, I. S. Gilmore, M. P. Seah, I. W. Fletcher. Topography and field effects in secondary ion mass spectrometry – Part I: Conducting samples. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2011**, *22*, 1718.
- [47] M. Noun. Interaction agrégats-surface. Spectrométrie de masse par temps de vol et application analytique à des études sur des médicaments et sur la météorite Paris. *PhD Dissertation [Online]*, Université Paris Sud – Paris XI, November, **2013**. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00906791> (accessed Feb 9, 2015)
- [48] M. Guilhaus. Principles and instrumentation in time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass. Spectrom.* **1995**, *30*, 1519.
- [49] M. Senoner, T. Wirth, W. E. S. Unger. Imaging surface analysis: Lateral resolution and its relation to contrast and noise. *J. Anal. At. Spectrom.* **2010**, *25*, 1440.
- [50] Y. Ishii, A. Isoya, T. Kojima, K. Arakawa. Estimation of keV submicron ion beam width using a knife-edge method. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B* **2003**, *211*, 415.
- [51] F. Benabdallah, A. Seyer, L. Quinton, D. Touboul, A. Brunelle, O. Laprévote. Mass spectrometry imaging of rat brain sections: nanomolar sensitivity with MALDI versus nanometre resolution by TOF-SIMS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396*, 151.

- [52] K. Richter, H. Nygren, P. Malmberg, B. Hagenhoff. Localization of fatty acids with selective chain length by imaging time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Microsc. Res. Tech.* **2007**, *70*, 640.
- [53] Y. Sugiura, Y. Konishi, N. Zaima, S. Kajihara, H. Nakanishi, R. Taguchi, M. Setou. Visualization of the cell-selective distribution of PUFA-containing phosphatidylcholines in mouse brain by imaging mass spectrometry. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, 1776.
- [54] I. V. Veryovkin, S. F. Belykh, A. Adriaens, A. V. Zinovev, F. Adams. On the trends in kinetic energies of secondary ions produced by polyatomic ion bombardment. *Appl. Surf. Sci.* **2004**, *231/232*, 101.
- [55] P. Sjövall, J. Lausmaa, B. Johansson. Mass spectrometric imaging of lipids in brain tissue. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4271.
- [56] H. Nygren, K. Börner, P. Malmberg, B. Hagenhoff. Localization of cholesterol in rat cerebellum with imaging TOF-SIMS: Effect of tissue preparation. *Appl. Surf. Sci.* **2006**, *252*, 6975.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's website.

Supplementary Information for

TOF-SIMS imaging of biological samples with delayed extraction for high mass and high spatial resolutions

Quentin P. Vanbellingen,^{†,‡} Nicolas Elie,^{†,‡} Michael J. Eller,[§] Serge Della-Negra,[§] David Touboul,[†] and Alain Brunelle^{*,†}

[†] Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS-ICSN UPR2301, Université Paris-Sud, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

[§] Institut de Physique Nucléaire, UMR8608, IN2P3-CNRS, Université Paris-Sud, 91406 Orsay, France

TABLE OF CONTENTS

Figure S-1: Peak width FWHM (ns) as a function of the extraction delay (a) negative ion mode, m/z 255.2 ([C16:0-H] ⁻ , blue) and m/z 385.4 (cholesterol [M-H] ⁻ , green) (b) positive ion mode, m/z 369.4 (cholesterol [M-H ₂ O+H] ⁺ , blue) and m/z 430.4 (Vitamin E [M] ⁺ , green).....	2
Figure S-2: Primary ion beam profiles (b,d,f) measured on a grid (a,c,e, pitch 25 μ m, hole width 19 μ m, wire width 6 μ m), for HCBU; BA; and BA+DE setting modes.....	2
Figure S-3: Part of TOF-SIMS negative ion mass spectra showing H ⁻ ion for different extraction delays. Vertical red line is to guide the eye and show the extraction delay for which the ions start shifting.	3
Figure S-4: Calculated arrival positions of secondary ions (m/z 400) on the surface of the MCP obtained by simulation for different kinetic energies: 0.1 eV (red); 0.2 eV (blue); 0.5 eV (orange) and 1.0 eV (green) with an extraction delay equal to the pulse duration (100 ns).....	3
Figure S-5: Calculated dispersion of secondary ion arrival positions (energy 0.1 eV) on the surface of the MCP obtained by simulation for different mass-to-charge ratios: m/z 1; 6; 12; 14; 23; 48 and 100 with an extraction delay equal to the pulse duration (100 ns).	4
Figure S-6: Parts of TOF-SIMS negative ion mass spectra recorded on the surface of a rat brain section, using HCBU, BA, and BA+DE setting modes and showing three deprotonated fatty acids: C16:0; C18:1 and C18:0.....	4
Figure S-7: Parts of TOF-SIMS positive ion mass spectra recorded on the surface of a rat brain section, using HCBU, BA, and BA+DE setting modes and showing two ion species of cholesterol (a,c,e) and the vitamin E isotopic distribution (b,d,f).	5

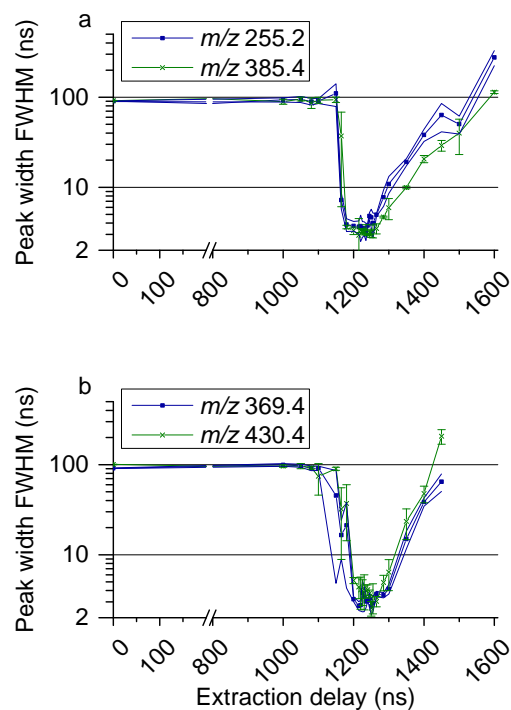


Figure S-1: Peak width FWHM (ns) as a function of the extraction delay (a) negative ion mode, m/z 255.2 ($[C_{16:0-H}]^-$, blue) and m/z 385.4 (cholesterol $[M-H]^-$, green) (b) positive ion mode, m/z 369.4 (cholesterol $[M-H_2O+H]^+$, blue) and m/z 430.4 (Vitamin E $[M]^+$, green).

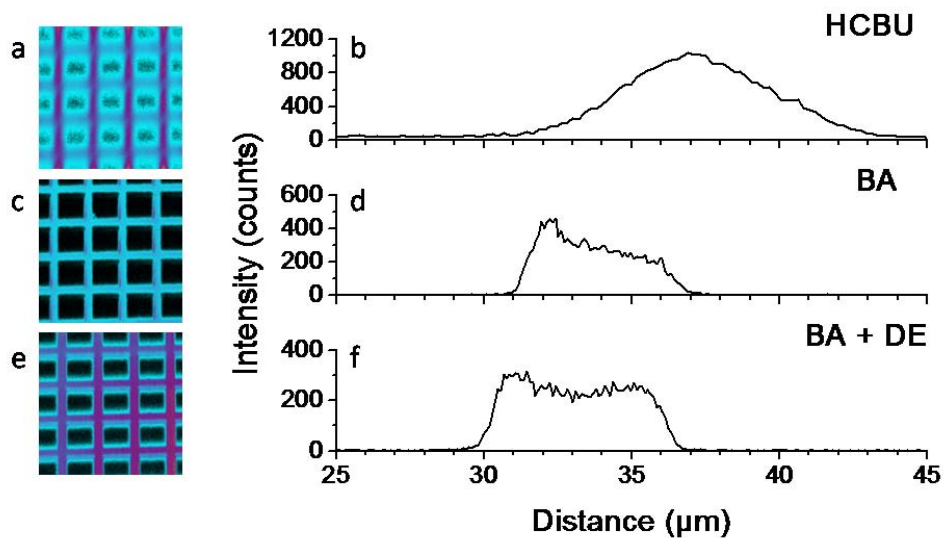


Figure S-2: Primary ion beam profiles (b,d,f) measured on a grid (a,c,e, pitch 25 μm , hole width 19 μm , wire width 6 μm), for HCBU; BA; and BA+DE setting modes.

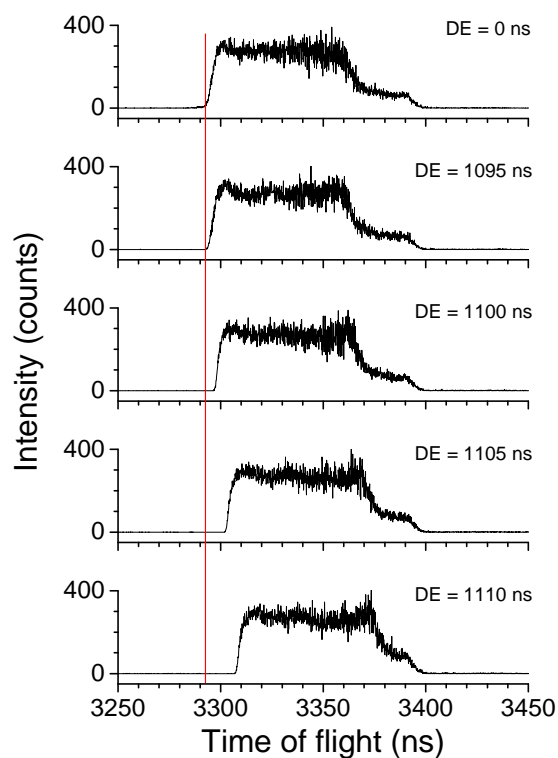


Figure S-3: Part of TOF-SIMS negative ion mass spectra showing H^- ion for different extraction delays. Vertical red line is to guide the eye and show the extraction delay for which the ions start shifting.

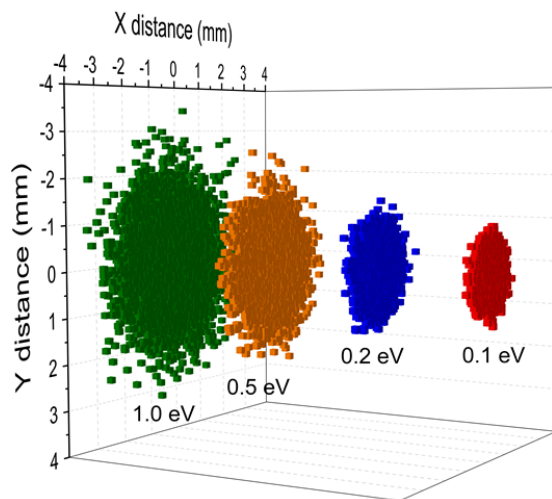


Figure S-4: Calculated arrival positions of secondary ions (m/z 400) on the surface of the MCP obtained by simulation for different kinetic energies: 0.1 eV (red); 0.2 eV (blue); 0.5 eV (orange) and 1.0 eV (green) with an extraction delay equal to the pulse duration (100 ns).

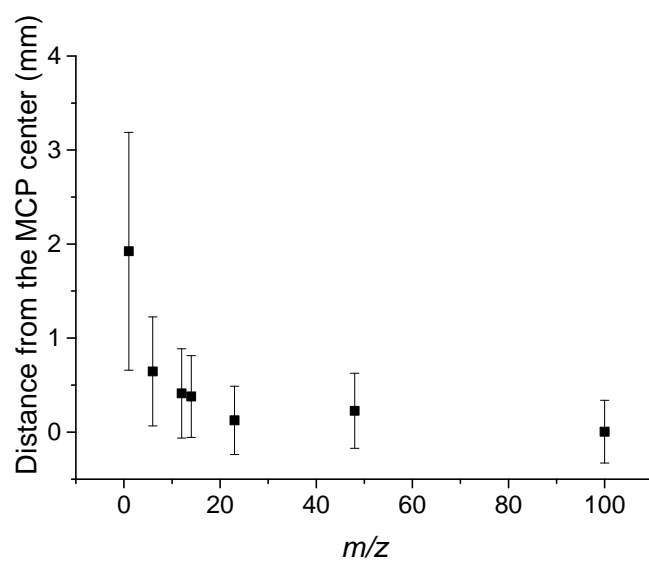


Figure S-5: Calculated dispersion of secondary ion arrival positions (energy 0.1 eV) on the surface of the MCP obtained by simulation for different mass-to-charge ratios: m/z 1; 6; 12; 14; 23; 48 and 100 with an extraction delay equal to the pulse duration (100 ns).

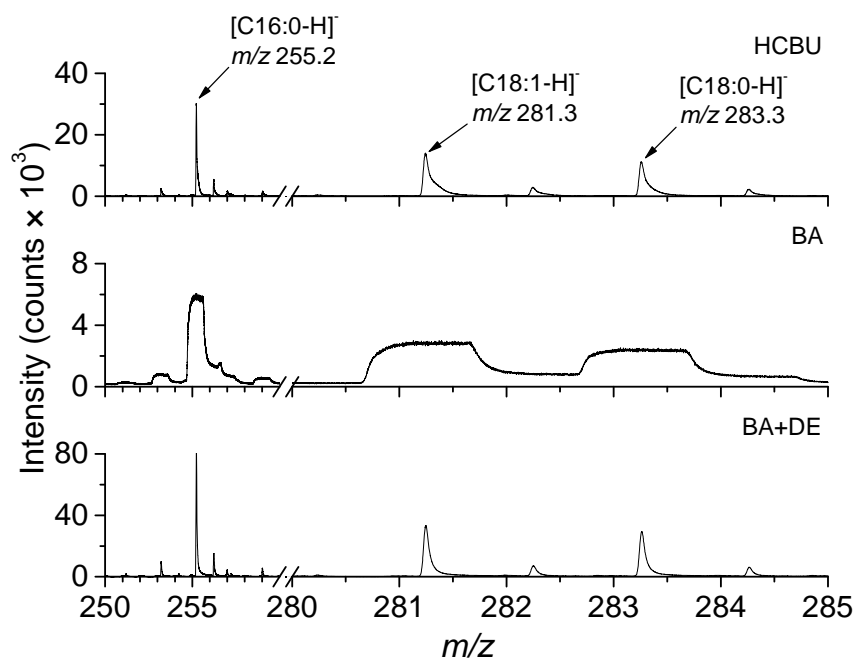


Figure S-6: Parts of TOF-SIMS negative ion mass spectra recorded on the surface of a rat brain section, using HCBU, BA, and BA+DE setting modes and showing three deprotonated fatty acids: C16:0; C18:1 and C18:0.

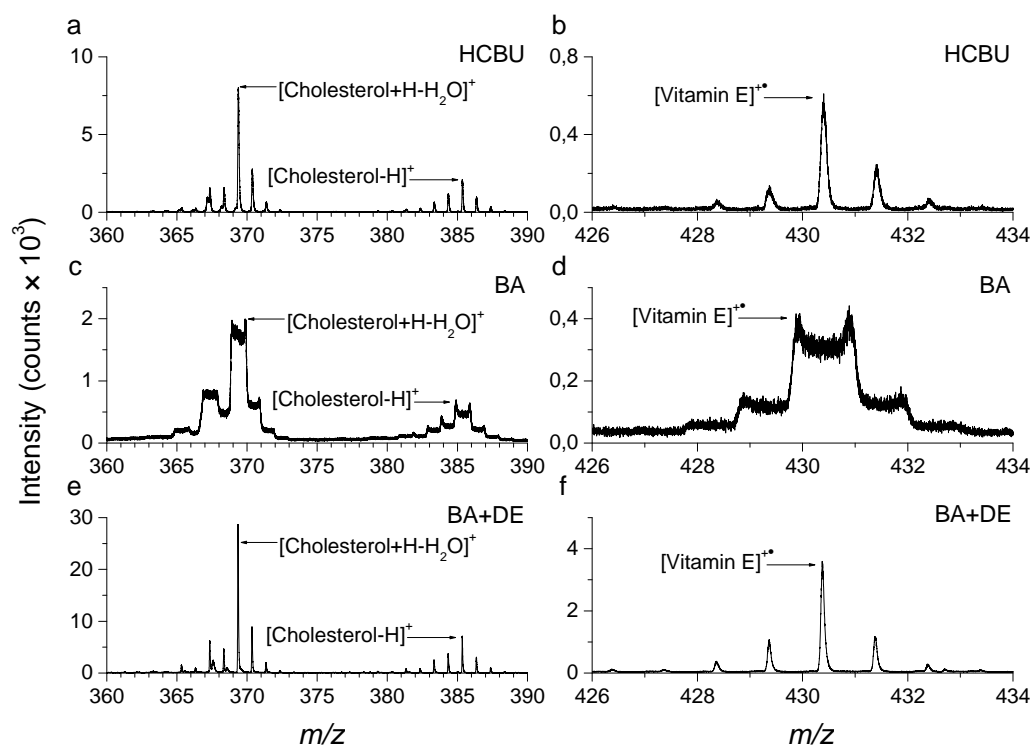


Figure S-7: Parts of TOF-SIMS positive ion mass spectra recorded on the surface of a rat brain section, using HCBU, BA, and BA+DE setting modes and showing two ion species of cholesterol (a,c,e) and the vitamin E isotopic distribution (b,d,f).

Titre : Imagerie de substances naturelles par spectrométrie de masse

Mots clés : Imagerie par spectrométrie de masse ; TOF-SIMS ; MALDI-TOF ; *Dicorynia guianensis*

Résumé : Cette thèse a été consacrée à l'amélioration de méthodes en imagerie par spectrométrie de masse, et à leur utilisation pour l'analyse *in situ* de substances naturelles. Une première partie a été consacrée à développer une nouvelle méthode permettant d'acquérir en imagerie TOF-SIMS des images avec une résolution de 400 nm tout en préservant la résolution en masse. Pour cela, une extraction retardée des ions secondaires a été caractérisée et optimisée. Une seconde partie a eu pour objectif d'étudier le phénomène de duraminisation d'un arbre tropical de l'espèce *Dicorynia guianensis*, qui est l'un des plus exploités en Guyane française et dont le duramen est réputé être imputrescible. Les images par spectrométrie de masse TOF-SIMS enregistrées avec la méthode développée ont montré à l'échelle sub-micrométrique les changements métaboliques s'opérant autour de la zone de transition, où s'opère la duraminisation.

Les techniques TOF-SIMS et MALDI-TOF ont ensuite été utilisées pour l'analyse d'une surface sur laquelle ont crû deux souches microbiennes en compétition. Les deux souches ont été extraites d'un if japonais (*Cephalotaxus harringtonia*), l'une étant un champignon endophyte (*Paraconiothyrium variable*) et l'autre une bactérie pathogène à ce conifère (*Bacillus subtilis*). Les résultats ont montré que le champignon était capable d'hydrolyser les surfactines produites par la bactérie. Enfin, les imageries par spectrométrie de masse MALDI-TOF et TOF-SIMS sont deux méthodes de choix pour l'étude de modèle *in vitro* de ce qui pourrait se produire *in vivo*.

Title : Mass Spectrometry Imaging of Natural Substances

Keywords : Mass Spectrometry Imaging ; TOF-SIMS ; MALDI-TOF ; *Dicorynia guianensis*

Abstract : This thesis was devoted to the improvement of mass spectrometry imaging methods, and to their use for *in situ* analysis of natural substances. The first part of this thesis has been dedicated to the development of a new acquisition mode in TOF-SIMS imaging able to acquire images with a high spatial resolution of 400 nm while keeping a good mass resolution. For that, a delayed extraction of the secondary ions has been characterized and optimized. Then, a second part has been dedicated to the study of heartwood production in a tropical species named *Dicorynia guianensis*. This species is one of the most exploited in French Guiana for its heartwood which exhibits a good durability.

Metabolic changes are shown by sub-micrometric resolution ion images recorded in and around the transition zone, where the heartwood formation occurs. Then, TOF-SIMS and MALDI-TOF have both been used to analyse the surface of a bacterial competition. Species have been isolated from a Japanese conifer (*Cephalotaxus harringtonia*), from which the stains are an endophytic fungi (*Paraconiothyrium variable*) and a pathogenic bacteria of the conifer (*Bacillus subtilis*). The results have shown that the fungus is able to hydrolyze surfactines produced by the bacteria during the competition. Furthermore, both the MALDI-TOF and the TOF-SIMS mass spectrometry imaging are methods of choice to study *in vitro* models of what could happen *in vivo*.